

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

METHODE ZUR BESTIMMUNG DER RESTAKTIVITÄT DER MENSCHLICHEN SERUM-CHOLINESTERASE NACH VERGIFTUNG MIT ECHOTHIOPHAT

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Elisabeth Häusler
aus Walderbach

1981 № 310



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546222_0088

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

METHODE ZUR BESTIMMUNG DER RESTAKTIVITÄT
DER MENSCHLICHEN SERUM-CHOLINESTERASE
NACH VERGIFTUNG MIT ECHOTHIOPHAT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Elisabeth Häusler
aus
Walderbach

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.1981

MEINEN ELTERN GEWIDMET



Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
B	Problemstellung	26
C	Experimentelle Untersuchungen	29
1)	Methode zur Messung der Serumcholinesterase-aktivität und deren Restaktivität nach Vergiftung mit Echothiophat bzw. DFP in der Warburg-Apparatur	29
a)	Bestimmung der geeigneten Konzentration und der spezifischen Inkubationsbedingungen für Echothiophat	29
b)	Gewinnung des Serums	32
c)	Angewandtes Meßverfahren	32
d)	Herstellung der DFP- bzw. Echothiophat-lösung	33
e)	Inkubation mit DFP bzw. Echothiophat	34
f)	Messung der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP bzw. Echothiophat	35
g)	Bestimmung der Restaktivität	36
h)	Präzision der verwendeten Meßmethode	36
i)	Kontrolle der Meßmethode anhand eines Testserums	39
2)	V Versuchsergebnisse	40
D	Diskussion und Zusammenfassung	48
E	Literaturverzeichnis	51

1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10
11	11
12	12
13	13
14	14
15	15
16	16
17	17
18	18
19	19
20	20
21	21
22	22
23	23
24	24
25	25
26	26
27	27
28	28
29	29
30	30
31	31
32	32
33	33
34	34
35	35
36	36
37	37
38	38
39	39
40	40
41	41
42	42
43	43
44	44
45	45
46	46
47	47
48	48
49	49
50	50
51	51
52	52
53	53
54	54
55	55
56	56
57	57
58	58
59	59
60	60
61	61
62	62
63	63
64	64
65	65
66	66
67	67
68	68
69	69
70	70
71	71
72	72
73	73
74	74
75	75
76	76
77	77
78	78
79	79
80	80
81	81
82	82
83	83
84	84
85	85
86	86
87	87
88	88
89	89
90	90
91	91
92	92
93	93
94	94
95	95
96	96
97	97
98	98
99	99
100	100

A Einleitung

Die Entwicklung der organischen Phosphorsäureester (Alkylphosphate) reicht bis ins vorige Jahrhundert zurück, die erste dieser Verbindungen, Tetraäthylphosphat, wurde bereits 1854 durch DE CLERMONT synthetisiert (FOPPE, HEMMELER, RUMMEL 1977).

Nach einer vorübergehenden Verlagerung der Schwerpunkte auf die Entwicklung von hochtoxischen und flüchtigen Kampfgasen in der Zeit der Weltkriege standen später vor allem die Untersuchungen über die biologische Wirksamkeit von Phosphorverbindungen in der Schädlingsbekämpfung im Vordergrund. SCHRADER deckte 1934 die insektiziden Eigenschaften dieser Verbindungen auf und begann mit einer systematischen Einteilung der Phosphorsäureester.

Ihre Grundstruktur läßt sich nach der SCHRADER-Formel vereinfacht darstellen (Abb. 1).

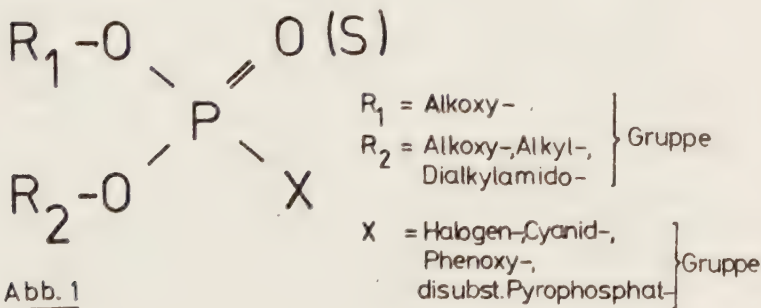


Abb. 1

Vereinfachte Darstellung der Alkylphosphate

Thiophosphate eignen sich für den Einsatz zur Schädlingsbekämpfung besser als Phosphate, da sie eine höhere Affinität zu lipophilen Zellmembranen

und größere Beständigkeit gegenüber hydrolytischen Einflüssen aufweisen.

Im Bereich der Medizin haben die Alkylphosphate große Bedeutung in der Toxikologie, daneben aber auch in der therapeutischen Anwendung in der Augenheilkunde.

Die hohe Toxizität der Verbindungen beruht auf einer nahezu irreversiblen, nicht kompetitiven Hemmung der Cholinesterase in Blut und Geweben des menschlichen Organismus. Anstelle der bei der enzymatischen Hydrolyse von Acetylcholin (ACh) auftretenden Acetylierung des esteratischen Zentrums der Cholinesterase (ChE) kommt es in Anwesenheit der Organophosphate zur Phosphorylierung dieses Zentrums. Die Dephosphorylierung erfolgt im Gegensatz zur Deacetylierung so langsam, daß eine irreversible Schädigung der ChE vorgetäuscht wird. Dieses Zentrum steht folglich für die Acetylcholin-Hydrolyse nicht mehr zur Verfügung, da ACh nicht in der Lage ist, den Phosphorrest von der ChE zu verdrängen. Durch die Anhäufung von nichthydrolysiertem ACh an den Synapsen resultiert eine endogene ACh-Vergiftung. Diese führt zu einer Übererregung der cholinergen postganglionären Synapsen im Bereich des vegetativen Nervensystems und der Motoneuronen. Das klinische Bild wird von Schweißausbrüchen, übermäßigem Speichelfluß, Übelkeit und Erbrechen, tonisch-klonischen Krämpfen, Sehstörungen und extremer Miosis beherrscht.

Nachdem bei Verwendung der Alkylphosphate als Insektizide resistente Stämme auftraten, die hydrolysierende Enzyme aufwiesen, stellte sich die Frage, ob die organischen Phosphorverbindungen auch im

Warmblüterorganismus durch spezifische enzymatische Spaltung abgebaut werden können.

Dazu wurden vor allem mit Parathion, bekannt als E 605 (Diäthyl-p-nitrophenyl-thionophosphat), ein als Insektizid weitverbreitetes Organophosphat, das im menschlichen Organismus zu Paraoxon (E 600, Diäthyl-p-nitrophenyl-phosphat) als eigentlich toxischer Substanz umgebaut wird, umfangreiche Untersuchungen angestellt (Abb. 2).

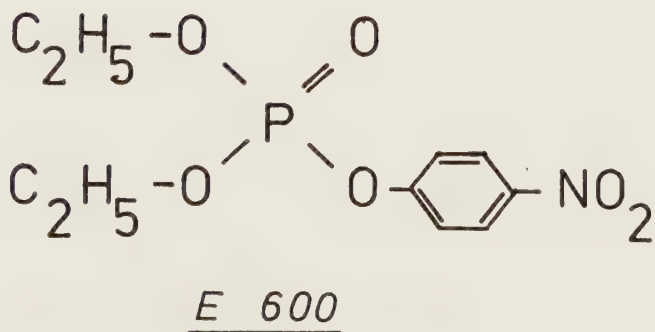
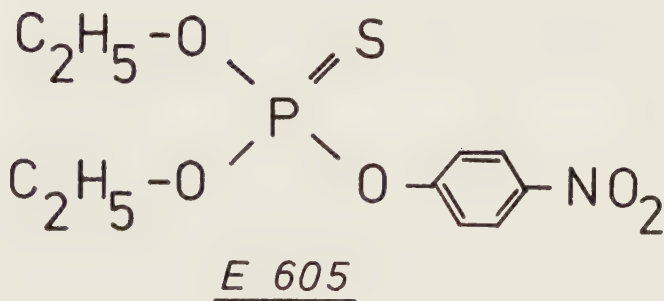


Abb. 2

Chemische Formeln von Parathion (E 605) und Paraoxon (E 600)

ALDRIDGE (1953a) fand im Serum verschiedener Tierarten sowie des Menschen zwei sich voneinander unterscheidende Esterasen, von denen die B-Esterase durch E 600 inaktiviert wurde, die A-Esterase dagegen nicht.

In einer weiteren Untersuchung entdeckte ALDRIDGE (1953b) ein E 600-hydrolysierendes Enzym (E 600-Esterase), das sich mit der bereits bekannten A-Esterase als identisch erwies.

KRISCH (1968) bestimmte spektrophotometrisch über p-Nitrophenol, das bei der Hydrolyse von Paraoxon als Spaltprodukt frei wird, die Aktivität der Serumarylesterase (Paraoxonase) und konnte darüber hinaus hinsichtlich der Aktivität der Paraoxonase zwei sich überlagernde Gruppen von Normalpersonen im Sinne einer bimodalen Verteilung unterscheiden.

Eine genauere Auftrennung dieser beiden Gruppen konnte nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. (1969) mit der Anticholinesterase-Technik in der Warburg-Apparatur gewonnen werden. Bei diesem Verfahren, das noch genauer erläutert wird, kann man, ausgehend von der Serumcholinesterase- Ausgangsaktivität, die relative Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 bestimmen.

Nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. (1972) zeigt die AntiChE-Technik eine hochsignifikante Korrelation zur direkten Bestimmung des abgespaltenen p-Nitrophenols mit der spektrophotometrischen Methode nach KRISCH. Allerdings gelang schon bei einem relativ kleinen Kollektiv eine sichere Aufteilung der Seren bezüglich ihrer ChE-Aktivität in drei Gruppen mit niederer, mittlerer und hoher Paraoxonase-aktivität.

Nachdem schon KRISCH aufgrund der Aktivitätsunterschiede einen genetisch determinierten Polymorphismus der menschlichen Serumparaoxonase für möglich hielt, konnten GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. (1973a) anhand von Familienuntersuchungen an 35 Familien mit 52 Kindern zeigen, daß der Vererbungsmodus der Paraoxonase-Aktivität einem einfachen zwei Allele-Modell mit trimodaler Aktivitätsverteilung folgt.

ZECH und ZÜRCHER (1974) sowie PLAYFER et al. (1976) konnten diese Ergebnisse mit der direkten photometrischen Technik durch Messung des von der Paraoxonase aus Paraoxon abgespaltenen p-Nitrophenol weitgehend bestätigen.

Auch über Diisopropyl-fluoro-phosphat (DFP) liegen bis jetzt mehrere Arbeiten zur Frage einer spezifischen enzymatischen Hydrolyse vor.

MAZUR und BODANSKI (1946a) fanden im Plasma wie auch in Geweben von Kaninchen und Menschen ein Enzym, das DFP hydrolysierte, mit bisher bekannten Cholinesterasen oder Phosphatasen aber nicht identisch war. DFP wurde nur zu einem sehr geringen Teil an der Alkyl-Ester-Bindung, hauptsächlich aber an der Phosphor-Fluor-Bindung gespalten.

Den gleichen Autoren gelang es wenig später (1946b), das gefundene Enzym auf das 30-fache zu konzentrieren ("Phosphofluorase").

Nach COHEN und WARRINGA (1954) wird DFP in Geweben einer enzymatischen Hydrolyse durch eine nicht näher beschriebene DFP-ase unterzogen, zum Teil aber auch an andere Proteine gebunden.

Wie mit E 600 wurden auch mit DFP mittels der Anticholinesterase-Technik in der Warburgapparatur

Versuche angestellt. Nach GREINER zeigt sich dabei ein eingipfliger Verlauf der Verteilungskurve der SerumChE-Restaktivität im Gegensatz zum dreigipfligen Verlauf bei E 600. Demzufolge muss ein anderes Enzymsystem für den Abbau von DFP als für E 600 verantwortlich sein.

Nachdem für Paraoxon der sichere Nachweis einer enzymatischen Hydrolyse mittels der AntiChE-Technik beschrieben wurde, sowie für DFP Untersuchungen in dieser Richtung angestellt wurden, soll in der vorliegenden Arbeit mit der gleichen Technik der Abbau eines weiteren Alkylphosphates, Echothiophat, in Gegenüberstellung zum Abbau von DFP behandelt werden.

Dazu scheinen zunächst einige Vorbemerkungen über chemische und physikalische Eigenschaften, Anwendungsbereiche, Wirkung im menschlichen Organismus sowohl über DFP als besonders über Echothiophat notwendig.

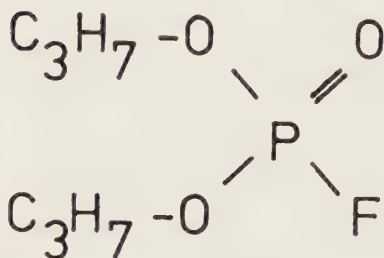
DFP

Chemische und physikalische Eigenschaften

Bereits 1941 wurde durch McCOMBIE und SOUNDERS (1946) Diisopropyl-fluoro-phosphat (DFP) synthetisiert, ein natürliches Vorkommen dieser Substanz ist bisher nicht bekannt (Abb. 3).

Unter Normalbedingungen liegt DFP in flüssigem Zustand vor, der Schmelzpunkt liegt unter 50°C , der Siedepunkt bei 183°C für 700 mmHg. Bei Zimmertemperatur (20°C) ergibt sich ein Dampfdruck von 0,97 mmHg. Gasförmiges DFP ist in niedrigen Konzentrationen unsichtbar und geruchlos (SILVER, 1948). In Wasser besteht nur sehr geringe Löslichkeit für

DFP, in Alkohol, Aceton, Aether, Benzin, Tetra-
chlorkohlenstoff dagegen läßt es sich gut lösen.
In der Medizin wird üblicherweise Erdnußöl als
Lösungsmittel verwendet (QUILLIAM, 1947; RAMACHANDRAN,
1971), da es die volle Wirksamkeit von DFP auch
noch nach drei Monaten gewährleistet (LEOPOLD und COMROE,
1946 b).



DFP

Abb. 3

Chemische Formel von DFP

Aufgrund der lipophilen Eigenschaften kann die
Blut-Hirn-Schranke leicht überwunden werden.

Anwendungsbereiche

Durch LEOPOLD und COMROE (1946a) wurde DFP als
erstes Organophosphat in die Therapie des Glaukoms
eingeführt.

Im Verhältnis zu den bis dahin verwendeten reversiblen
ChE-hemmern wie Physostigmin (LAQUEUR, 1876) und
Prostigmin (MYERSON und THAN, 1937) konnte mit DFP
eine gleichmäßigere und anhaltende Senkung des
intraoculären Druckes erzielt werden (HOFFMANN, 1971).

Verantwortlich für diesen Effekt soll nach KADIN (1963) nicht allein die Hemmung der ChE und die Miosis, sondern eine Minderung des Abflußwiderstandes sein.

In der Therapie der Myasthenia gravis spielt DFP keine große Rolle mehr, da es dem Neostigmin lediglich in der Wirkungsdauer überlegen ist (QUILLIAM, 1947). Um einen Anstieg der Muskelkraft im ganzen Körper zu erreichen, muß DFP in einer Dosis gegeben werden, die zu unangenehmen Nebenwirkungen führt.

Nach GELLMAN (1963, 1964) hat sich DFP außerdem bei Akkomodationsstörungen, die auf einer starken Hypermetropie beruhen, und als Hilfsmittel bei der Diagnose des konvergenten Strabismus bewährt.

Aufgrund einer dauerhaften Bindung an Erythrozyten und Leukozyten wird DFP als radioaktives DFP³² bei klinischen Untersuchungen zur Markierung der Blutkörperchen verwendet und dient dadurch zu Verteilungs- und Lebensdauerbestimmungen (HJORT, 1960; BARR et al., 1975; NOWOTNY et al., 1970).

Reaktionsmechanismen, Verteilung und Wirkung im menschlichen Organismus

Nach der Aufnahme in lebenden Organismen bestehen drei Reaktionsmöglichkeiten für DFP:

- a) die spontane Hydrolyse, die allerdings nur eine untergeordnete Rolle spielt,
- b) die enzymatische Hydrolyse durch Bindung an die "DFP-ase",
- c) die Bindung an Proteine, die in der Regel irreversibel ist, z.B. an die Cholinesterase.

Als primäre Reaktionspartner bei der Bindung des

DFP an Proteine vermutet man Tryptophan, Tyrosin und Histidin. Bei der Anlagerung von DFP an eine dieser Aminosäuren wird ein Fluoridion freigesetzt, zwischen dem Aminosäurerest und Diisopropylphosphat (DIP) entsteht eine Esterbindung. Für die Umwandlung dieser reversiblen in eine irreversible Bindung (ageing process) wird eine "Wanderung" des DIP vom primären Reaktionspartner an einen nicht N-terminalen Serin-rest daneben verantwortlich gemacht (NEURATH, 1965; MOUNTER et al., 1957). Proteine, die primär mit DFP reagieren, denen aber ein Serinrest in der Nachbarschaft der DIP-Proteinbindung fehlt, so daß die energiereiche Bindung spontan wieder gelöst wird, werden als DFP-asen bezeichnet (E.C. 3.8.2.1.).

Das Hydrolyseprodukt DIP wird nicht weiter metabolisiert oder gespeichert, sondern über die Niere wieder ausgeschieden. Als Ausdruck der DFP-ase-Aktivität im menschlichen Organismus kann die hohe DIP-Ausscheidung im Urin innerhalb der ersten Stunde nach Applikation gewertet werden (33%), ein weiteres Drittel wird während der folgenden neun Tage ausgeschieden (COHEN und WARRINGA, 1957).

Verteilungsstudien von JANDORF und McNAMARA (1950) ergaben, daß DFP, soweit nicht bereits im Blut an korpuskuläre Elemente und Plasmaproteine gebunden, aufgrund seiner ausgeprägten Affinität zu den verschiedensten Proteinen rasch in durchbluteten Geweben absorbiert wird. Zu einer Anreicherung kommt es in Leber, Lunge und Niere, in allen anderen Geweben bleibt die Konzentration kleiner als im Plasma.

Auf diesen Untersuchungen basieren die Ergebnisse von COHEN und WARRINGA (1954). Danach wird DFP in

den Geweben teils einer enzymatischen Hydrolyse durch eine nicht näher beschriebene DFP-ase unterzogen, teils an Proteine gebunden. DIP, das bei der Hydrolyse anfällt, wird im Gewebe weder gespeichert noch weiter metabolisiert, sondern sofort über Urin und Galle ausgeschieden.

Die Bindung des DFP an Proteine ohne DFP-ase-Eigenschaft ist irreversibel und wird erst bei Proteinolyse gelöst.

Nach HANSEN et al. (1968) liegen eine Minute nach Aufnahme von freiem DFP bereits 85 % in Form des proteingebundenen DIP vor.

Das cerebrale Gewebe reagiert, wie FREEDMAN et al. (1949) zeigen konnte, extrem empfindlich auf Gabe von DFP. Nach FORTH et al. (1977) ist daran die Cholinesterase nicht ursächlich beteiligt, vielmehr nimmt man eine irreversible Hemmung einer unspezifischen Carboxylesterase im ZNS an, deren physiologische Funktion noch offen ist.

Wichtig für unsere Untersuchungen ist die Tatsache, daß DFP im Blut zum überwiegenden Teil an Cholinesterasen gebunden vorliegt. MAZUR und BODANSKY (1946a) fanden bei Bestimmung der ChE-Konzentration im Serum, in Erythrozyten und im Gehirn von Kaninchen und Affen nach DFP-Intoxikation stark erniedrigte Werte für die Aktivität der ChE.

HERMANS und MARYNEN DE PRETER (1972) zeigten, daß bei Anwendung von DFP in der Therapie des Glaukoms der Pseudocholinesterase-spiegel im Serum bis zu 98 %, der AcetylChE-spiegel bis zu 50 % gesenkt wird.

Die meisten klinischen Symptome einer akuten

DFP-Intoxikation sind mit ausgeprägter ChE-Hemmung erklärbar, besonders aber nach hochdosierter DFP-Gabe können Phänomene auftreten, die nicht auf den Anstieg von Acetylcholin (ACh) zurückzuführen sind.

An isolierten Muskelpräparaten konnte nämlich nach hohen Dosen DFP keine Muskelkontraktion ausgelöst werden (NAESS, 1956). Da diese Blockade mit großen Gaben von ACh nicht reproduzierbar war, führt der Autor diese Erscheinung auf eine reversible Bindung von DFP an Rezeptoren zurück. Bei intracardialen Synapsen des Nervus vagus, an parasympathischen Ganglien der Bronchialinnervation, des Gastrointestinaltraktes und der Blase fand VERBEKE (1948, 1949) eine ähnliche Bindung von DFP an Rezeptoren und eine daraus resultierende nicotinartige Wirkung.

Das Bild der akuten Intoxikation beim Menschen wird von allgemeiner Muskelschwäche, begleitet von spontanen Muskelfaszikulationen beherrscht. Daran schließen sich vermehrt Zeichen einer muscarinartigen Vergiftung an, wie erhöhte Salivation, Diarrhoe und spontaner Urinabgang. Nach Krampfanfällen tritt innerhalb weniger Stunden der Tod infolge einer Atemlähmung ein (HORTON et al., 1946). Diese Symptomatik ist nach HEYMANS und CASIER (1948) weniger Folge der erniedrigten ChE-Aktivität, als vielmehr Ausdruck der Eigenwirkung von DFP.

Alle beschriebenen Fälle (SEDAN, 1952; MOORE, 1956; ERDMAN und LATKI, 1960; SCHLAAK, 1966) gehen auf Unachtsamkeit bei der Herstellung oder Anwendung von DFP in biochemischen Laboratorien als Unfallursache zurück. Eine akute Intoxikation als Folge therapeutischer Anwendung von DFP-haltigen Medikamenten

ist nicht bekannt.

Dagegen kann es bei längerer Verabreichung von therapeutischen Dosen zu einer chronischen Intoxikation kommen, die sich klinisch in anderen Symptomen äußert. COMROE et al. (1946), GROB et al. (1947a, 1947b) und HARVEY et al. (1947) untersuchten die Auswirkung einer chronischen Applikation von DFP in einer Dosis von 0,5-2,0 mg/kg/die i.m. bzw. 6-8 mg per os beim Menschen. Erwartungsgemäß zeigte sich auch hier der muscarinartige und nicotinartige Effekt cholinergischer Mittel.

An erster Stelle stehen jedoch Symptome von Seiten des ZNS wie exzessives Träumen, Schlaflosigkeit, Verwirrtheit, motorische Unruhe, vermehrte Anspannung, emotionelle Labilität, Tremor, Alpträume, Parästhesien, visuelle Halluzinationen und Nervenschmerzen. Gleichzeitig treten Veränderungen im EEG auf im Sinne einer gesteigerten neuralen Aktivität: die Frequenz der Wellen ist erhöht, die Amplituden sind vergrößert, intermittierend bestehen Arrhythmien und anormale Wellen.

Erst nach erheblich höheren Dosen treten gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit und Erbrechen, Bauchkrämpfe und Diarrhoe in den Vordergrund. Selten klagen die Patienten über vermehrte Transpiration, Salivation, Miosis, Ciliarspasmen, Bronchokonstriktion, Tenesmen und Bradykardie.

Als optimale Therapie einer DFP-Intoxikation hat sich eine Kombination von symptomatisch und kausal wirkenden Substanzen etabliert.

Neben Atropin als ACh-Antagonist und Valium^R als Antikonvulsivum werden als Antidot sogenannte ChE-Reaktivatoren gegeben. Bestimmte Oxime wie Toxogonin^R (Obidoxim-chlorid) und Pralidoxim (Pyridin-

2-aldoxim-methyljodid) sind in der Lage, die Diisopropyl-phosphoryl-Seryl-Bindung zu lösen und das Enzym zu dephosphorylieren. Entscheidend für den Erfolg ist ein möglichst frühzeitiger Therapiebeginn, da im Lauf der Zeit an der phosphorylierten Esterase eine enzymatische Abspaltung eines Alkylrestes vom Phosphatrest stattfindet (Alterung), und damit die Voraussetzungen für den nucleophilen Angriff des Oxims fehlen (FORTH et al., 1977; RUMP et al., 1975).

ECHOTHIOPHAT

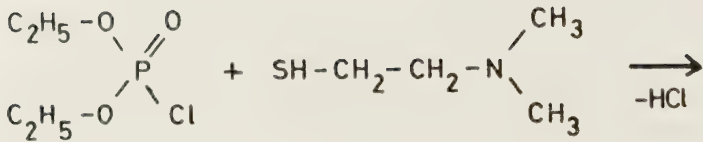
Chemische und physikalische Eigenschaften

Echothiophat (Thiophosphorsäure-0.0-diäthylester-S- 2-trimethylammonio-äthylester (Jodid)) zählt zu den irreversiblen Cholinesterasehemmern. Die Synthese ist in Abb. 4 dargestellt.

Hierbei wird Dimethyl-amino-äthyl-mercaptan mit Phosphorsäure-diäthyl-esterchlorid umgesetzt, anschließend das Stickstoffatom quaterniert (EHRHART, 1972).

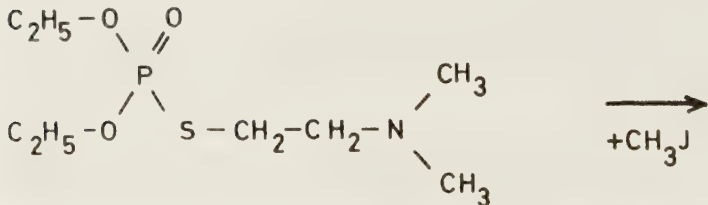
Echothiophat-jodid ist in Pulverform unbegrenzt haltbar; im Gegensatz zu DFP zeigt es aufgrund des quaternären Stickstoffatoms nur geringe Lipidlöslichkeit.

Für therapeutische Zwecke ist es in wässriger Lösung im Handel, die bei Aufbewahrung im Kühlschrank nach vier Wochen einen Abfall auf 90%, bei Raumtemperatur auf 83% der Ausgangstoxizität zeigt (HAVENER, 1974).

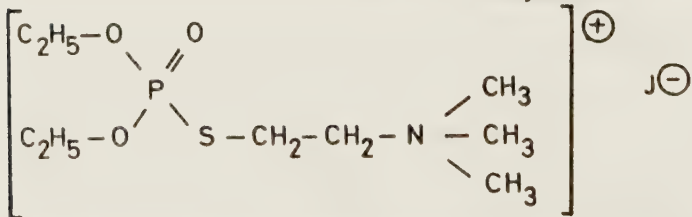


Diäthyl-phosphorsäure-
esterchlorid

Dimethyl-amino-
äthyl-mercaptan



Thiophosphorsäure-O,O-diäthylester-S-[2-dimethylamino-
äthylester]



Thiophosphorsäure-O,O-diäthylester-S-[2-trimethylammonio-
äthylester] (Jodid)

Abb. 4

Synthese von Echothiophat-jodid

Bedingt durch die geringe Lipidlöslichkeit kann Echothiophat im Gegensatz zu den meisten anderen Alkylphosphaten die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden (WAHL und TYNER, 1965).

Anwendungsbereiche und Dosierung

Echothiophat wird, wie viele andere Alkylphosphate, als Insektizid eingesetzt. Der Hauptanwendungsbereich liegt aber auf dem Gebiet der Augenheilkunde, vor allem in der Therapie des Glaukoms.

DFP wurde bereits 1946 zur Senkung des Augeninnendruckes verwendet, war allerdings mit hohen Nebenwirkungen verbunden. Auf der Suche nach zuverlässigeren Präparaten entdeckten LEOPOLD, GOLD und GOLD (1957) Echothiophat (Phospholine Iodide) für die Glaukomtherapie. Besonders in den Fällen, in denen reversible Cholinesterasehemmer oder direkte Parasympathomimetika wie Pilocarpin nicht zu einer befriedigenden Behandlung führen, wird diese Verbindung im anglo-amerikanischen Raum eingesetzt (HOFFMANN, 1971).

Bei ersten Untersuchungen durch BECKER et al. (1959) konnte in 50% der Fälle, die mit anderen Mitteln nicht zu beeinflussen waren, mit Echothiophat eine ausreichende Senkung des Abflusswiderstandes erzielt werden.

Darüberhinaus wird eine Verwendung zur Verbesserung der Sehschärfe (COHEN, 1966) und zur Schielbehandlung (BREININ et al., 1966) diskutiert.

OSSERMAN et al. (1961) versuchten mit Echothiophat eine Therapie der Myasthenia gravis.

Für die Anwendung am Auge wird Echothiophat als wässrige Lösung zum Eintropfen hergestellt, die üblichen Verdünnungen reichen von 0,01 %igen bis 0,25 %igen Lösungen. Mit einer 0,06 %igen Konzentration konnte in vielen Fällen eine befriedigende

Behandlung ohne systemisch-toxische Nebenwirkungen erreicht werden, während unter der Therapie mit 0,25 %iger Konzentration schon 50% der Patienten über Beschwerden klagten (HAVENER, 1974).

Reaktionsmechanismen, Verteilung und Wirkung im menschlichen Organismus

Die Reaktionsmechanismen für Echothiophat im menschlichen Organismus wurden bisher noch nicht so ausführlich wie für DFP untersucht. Sicher ist die Reaktion mit Cholinesterasen im Blut wie im Gewebe, daneben spielt für die Inaktivierung auch die Bindung an andere Proteine eine Rolle. Möglich ist ebenfalls, wie bei DFP, eine spezifische enzymatische Hydrolyse, eine mögliche "Echothiophatase".

Verteilungsstudien anhand der Cholinesterase(ChE)-hemmung in verschiedenen Geweben zeigen, daß Echothiophat nach Anwendung am Auge hauptsächlich in Ileum und Colon und in verschiedenen Geweben am Auge eine deutliche Senkung des ChE-spiegels herbeiführt. Im Gegensatz zu DFP wird die ChE im Gehirn und im Nervensystem in niedrigen Konzentrationen überhaupt nicht, in hohen Konzentrationen nur in geringem Maß beeinträchtigt (WILENSKY et al., 1967).

Aus diesen Studien lassen sich die Intoxikationserscheinungen wie folgt erklären:

Neben lokalen Symptomen wie Brauensmerz und Kopfschmerz kommt es durch die Resorption über die Mukosa der Konjunktiven und über den Nasopharynx zur systemischen Wirkung. Dabei sind

Diarrhoe, Erbrechen, Darmkoliken, allgemeine Müdigkeit und Schwäche die ersten Symptome.

Zahlreiche Autoren berichten sogar über akute cholinergische Krisen nach der Anwendung von Echothiophat-Tropfen am Auge in durchaus üblicher Dosierung (HISCOX und McCULLOCH, 1965; BEN-DOOR und WEISENBERG, 1966; HALLETT und CULLEN, 1972).

Bei allen Patienten mit derartigen Erscheinungen zeigten sich nach Bestimmung der ChE deutlich erniedrigte Enzymspiegel. Andererseits fanden sich aber auch Patienten mit deutlich herabgesetzter ChE-Aktivität, die keinerlei Vergiftungserscheinungen aufwiesen. Zahlreiche Untersuchungen wurden bisher durchgeführt, um die Beziehung zwischen verabreichter Echothiophat-Dosis, daraus resultierender ChE-Hemmung (Plasma- und AcetylChE) und dem Auftreten von systemisch-toxischen Nebenwirkungen zu klären. Dabei zeigten sich folgende Ergebnisse:

DE ROETHH et al. (1965) bestimmten bei sechs Patienten, die zweimal pro Tag an beiden Augen Echothiophat-Tropfen in 0,25 %iger Konzentration verwendeten, während der Behandlungszeit (vier Monate) den ChE-Spiegel. Bei allen zeigte sich ein signifikanter Abfall der Plasma- wie auch der Acetylcholinesterase (Abb. 5 und 6).

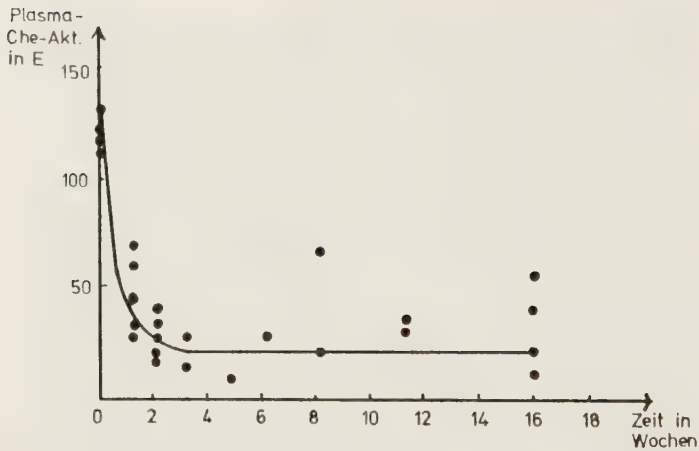


Abb. 5

PlasmaChe-spiegel bei sechs Patienten unter Behandlung mit Echothiophatlösung (0,25%ig) zweimal pro Tag an jedem Auge

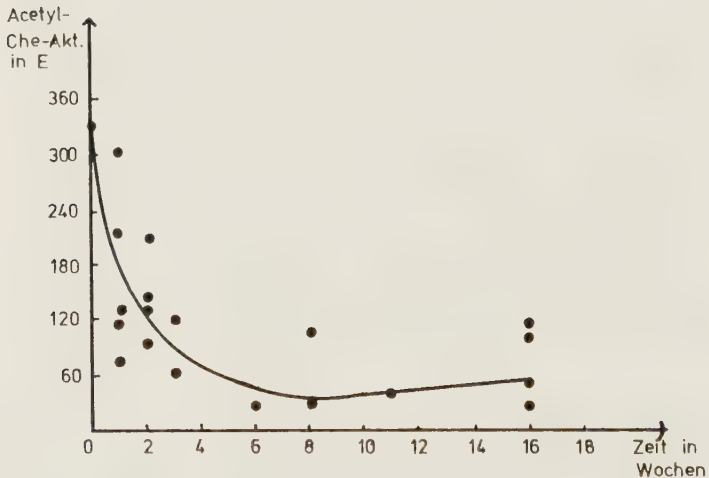


Abb. 6

AcetylChE-spiegel bei sechs Patienten unter Behandlung mit Echothiophatlösung (0,25 %ig) zweimal pro Tag an jedem Auge

MURRAY McGAVIN (1965) stellte ebenfalls einen signifikanten Abfall der PseudoChE bei fünf Patienten nach Behandlung mit 0,25 %iger Echothiophatlösung fest. In seiner Darstellung (Abb. 7) läßt sich jedoch eine individuelle Reaktion des einzelnen Patienten auf die gleiche Dosis erkennen. So wurde bei einem Probanden (a) trotz hoher ChE-Ausgangsaktivität das Enzym nach einigen Tagen in hohem Maß gehemmt, während bei einem anderen Patienten (b) mit niedriger ChE-Ausgangsaktivität die Blockierung geringer blieb.

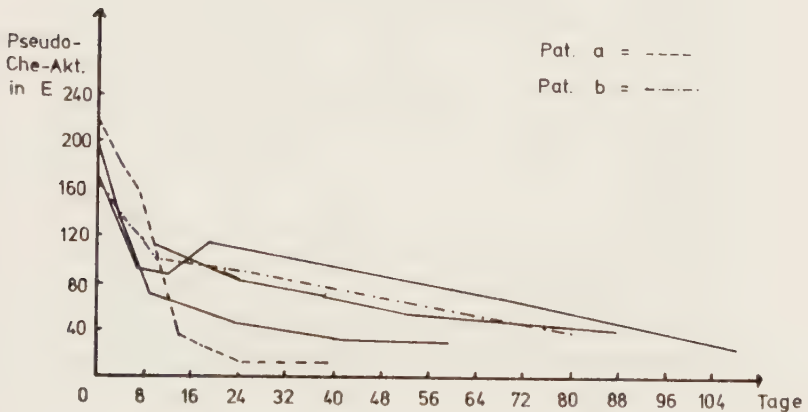


Abb. 7

PseudoChE-spiegel bei fünf Patienten unter Behandlung mit Echothiophat-tropfen (0,25%ig)

WAHL und TYNER (1965) untersuchten den Effekt einer 0,0625 %igen Lösung, also einer wesentlich schwächeren, aber häufiger verwendeten Konzentration. Hier war bei allen Patienten der AcetylChE-spiegel

niedriger als vor der Behandlung, der PlasmaChE-spiegel bewegte sich allerdings bei einigen Patienten im Normalbereich trotz gleicher Dosierung und obwohl die Behandlung einige Monate andauerte.

Eine Tendenz zu etwas niedrigeren Werten, aber keinen signifikanten Abfall der ChE-Ausgangsaktivität fanden KITAMURA et al. (1974) bei der Behandlung von 29 Kindern mit 0,06 %iger Echothiophatlösung. Da diese Untersucher von den Durchschnittswerten aller Kinder ausgingen, also nicht die Einzelwerte eines Patienten miteinander verglichen, dürfte das Ergebnis insgesamt den Untersuchungen von WAHL und TYNER entsprechen. KITAMURA et al. konnten darüberhinaus keine Beziehung zwischen der Dauer der Behandlung und der ChE-Aktivität herstellen, d.h. der ChE-spiegel bewegte sich auch nach mehrmonatiger Behandlung um den gleichen erniedrigten Wert wie nach sechs bis acht Wochen.

Ebenfalls bei Kindern untersuchten ELLIS und ESTERDAHL (1967) die Auswirkung einer 0,06 %igen Echothiophatlösung. Sie fanden, ausgehend von den Einzelwerten vor der Behandlung, in hohem Maß differierende Werte für das Ausmaß der ChE-blockierung. Die Enzymaktivität war bei gleicher Dosierung um 27% bis 85% herabgesetzt.

Zusammenfassend läßt sich aus den bisher aufgeführten Untersuchungen ersehen, daß die ChE-Aktivität nach Anwendung von Echothiophat in fast allen Fällen erniedrigt war. Das Ausmaß der Hemmung ist dabei neben anderen Ursachen von der verwendeten Konzentration abhängig, wie die folgenden Arbeiten

zeigen.

DE ROETHH et al. (1966) verglichen bei drei Gruppen von Patienten, die jeweils mit der gleichen Dosis einer 0,03 %igen, 0,06 %igen bzw. 0,25 %igen Echothiophatlösung behandelt wurden, die Plasma-ChE-Aktivität über ein Jahr lang (Abb. 8).

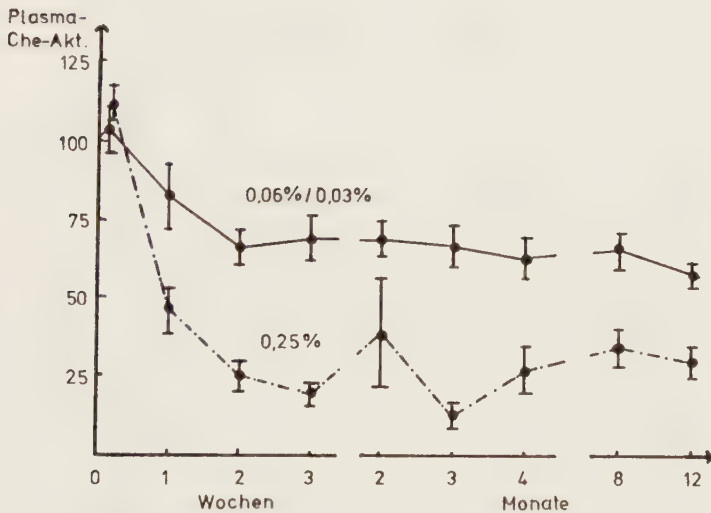


Abb. 8

PlasmaChE-Aktivität von Patienten unter Behandlung mit 0,03/0,06 %iger bzw. 0,25 %iger Echothiophatlösung

Die beiden Gruppen, die mit 0,03 %iger bzw. 0,06 %iger Lösung behandelt wurden, lassen sich nach dem Ausmaß der Enzymblockade nicht unterscheiden (35-40%).

Bei der dritten Gruppe zeigt sich eine Hemmung der Enzymaktivität um 75 bis 80% innerhalb der ersten drei Wochen nach Beginn der Behandlung.

Der größte Abfall der ChE-Aktivität zeigt sich

sowohl bei 0,03/0,06 %iger als auch bei 0,25 %iger Lösung während der ersten Woche. Nach ungefähr einem Monat ist das Maximum der Hemmung erreicht, der ChE-Spiegel bleibt danach etwa auf der gleichen Höhe.

Ähnliche Ergebnisse bringen auch HISCOX und McCULLOCH (1966) und WILENSKY et al. (1967) in ihren Untersuchungen. Man kann also folgern, daß stärker konzentrierte Lösungen im allgemeinen eine höhere Enzymhemmung bewirken, daß aber auf die gleiche Dosis die ChE-Hemmung unterschiedlich hoch ausfallen kann. Das läßt an unterschiedliche individuelle Reaktionsweisen denken, ähnlich wie dies GELDMACHER-v.MALLINCK-RODT et al. (1969) für die Wirkung von Paraoxon auf die menschliche Serumcholinesterase fanden.

Mehrere Autoren (BEN-DOOR und WEISENBERG, 1966; DE ROETH et al., 1966; HISCOX und McCULLOCH, 1966; ELLIS und ESTERDAHL, 1967) berichten von systemischen Nebenwirkungen nach Anwendung von Echothiophat-Augentropfen. Wie schon erwähnt, fand man beim Auftreten von akuten cholinergen Vergiftungserscheinungen die ChE-Aktivität meist um mehr als 50 % ihres Ausgangswertes erniedrigt. Bisher kann man aber das Auftreten von systemisch-toxischen Nebenwirkungen nicht mit einem bestimmten Ausmaß der ChE-Hemmung in direkte Beziehung setzen.

Nach Absetzen der Therapie mit Echothiophat-iodid steigt die ChE-Aktivität innerhalb kurzer Zeit (ca. 3-4 Wochen) wieder zum normalen, vor der Behandlung gemessenen Wert an (Abb. 9 und 10).

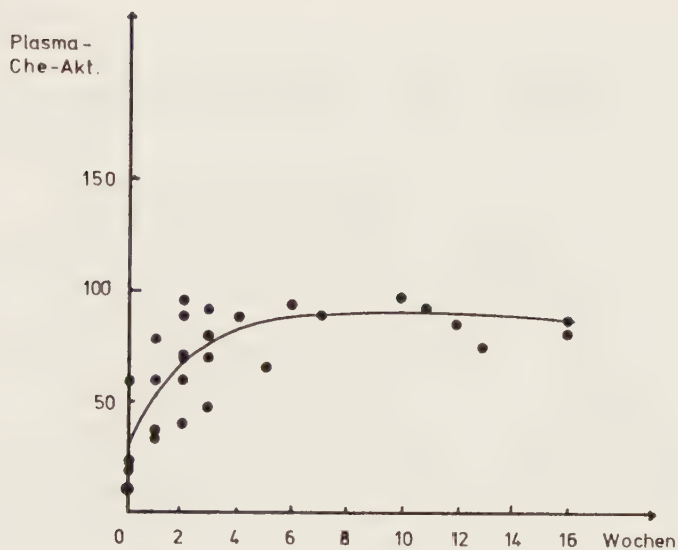


Abb. 9

PlasmaChE-spiegel bei sechs Pat. nach Beendigung der Therapie mit 0,25 %iger Echothiophatlsg.

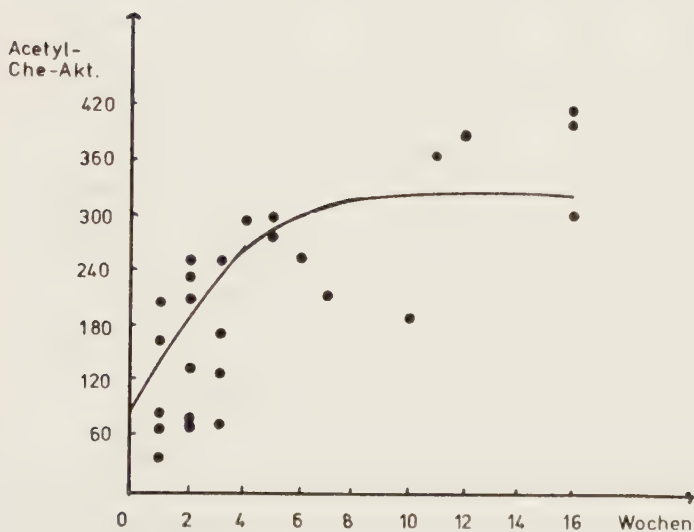


Abb. 10

AcetylChE-spiegel bei sechs Pat. nach Beendigung der Therapie mit 0,25 %iger Echothiophatlsg.

Die PlasmaChE zeigt eine schnellere Erholung als die AcetylChE, bei beiden Arten geht die Entgiftung erstaunlich schnell vor sich (DE ROETH et al., 1965).

HISCOX und McCULLOCH (1965), die detailliert eine akute cholinerge Krise bei einer 72-jährigen Frau schildern, erwarteten, daß die Regenerationsdauer der AcetylChE ungefähr der der Erythrozytopoese entspreche und erst nach ausreichender Neubildung von Erythrozyten die Enzymaktivität wieder im normalen Bereich liege. "Unerklärlicherweise" ging aber die Erholung der AcetylChE wesentlich rascher vor sich, nach ca. sechs Wochen waren wieder normale Spiegel erreicht, bei der PlasmaChE sogar schon nach vier Wochen.

FAFF et al. (1975) fanden bei ihren Experimenten mit Ratten ebenfalls eine äußerst rasche Regenerationszeit für die PlasmaChE vor, die sie mit spontaner Reaktivierung erklärten. Die Autoren beobachteten unter der 28 Tage andauernden Behandlung zunächst, wie andere Autoren auch, einen raschen Abfall der PlasmaChE in den ersten Tagen. Bei weiterer gleichbleibender Echothiophatzufuhr verzeichneten sie allerdings anschließend einen leichten Anstieg der PlasmaChE-Aktivität. Dieses Phänomen versuchten die Autoren mit einer Stimulierung der Regenerationsrate unter chronischer Echothiophateinwirkung zu erklären. Diese Vermutung mag durchaus richtig sein, zusätzlich lassen sich aber auch andere Erklärungen für dieses Phänomen finden.

Nachdem für Paraoxon die Existenz spezifischer hydrolysierender Enzyme im Serum nachgewiesen werden konnte, legen die aufgeführten Untersuchungen

den Schluß nahe, daß auch für Echothiophat Inaktivierungssysteme in individueller Ausprägung im menschlichen Organismus vorhanden sind.

Mit der Wirkung eines für Echothiophat möglicherweise spezifischen Enzyms ("Echothiophatase") liesse sich demzufolge die schnelle Erholungsrate der Cholinesterase nach Echothiophattherapie und der leichte Anstieg der PlasmaChE in der vorher erwähnten Arbeit erklären.

Die unterschiedliche Reaktion der Cholinesterase im Serum auf gleiche Echothiophatdosen liesse sich mit einer gegebenenfalls genetisch determinierten unterschiedlichen Ausprägung der Echothiophatase-Aktivität verständlich machen, wie bei der Paraoxonase bereits nachgewiesen werden konnte (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. 1973a).

B Problemstellung

Bis jetzt liegen bereits zahlreiche Arbeiten über den enzymatischen Abbau von Alkylphosphaten vor.

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al. (1969) belegten in mehreren Versuchen die Existenz der Paraoxonase, eines spezifischen Enzyms im menschlichen Serum für den Abbau von Paraoxon und einiger weniger nahe verwandter Verbindungen. In weiteren Untersuchungen konnten sie den genetisch determinierten Polymorphismus, der vermutlich einem 2-Allele-Modell mit trimodaler Aktivitätsverteilung der Paraoxonspaltung folgt, bestätigen (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al., 1979).

Die Bestimmung der Paraoxonaseaktivität erfolgte über die Messung der Serumcholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 in der Warburgapparatur und über die photometrische Messung des abgespaltenen p-Nitrophenol nach der Methode von KRISCH (1968).

Beide Methoden zeigen eine hochsignifikante Korrelation (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al., 1972).

GREINER (1980) untersuchte ebenfalls mittels der Anticholinesterase-Technik in der Warburgapparatur die ChE-Restaktivität im menschlichen Serum nach Inkubation mit DFP. Für den bis jetzt noch relativ kleinen Kreis von Versuchspersonen ergab sich jedoch eine unimodale Verteilung. Zur Frage einer möglichen genetischen Determination konnte bisher noch kein Modell erstellt werden.

Diesen Ergebnissen zufolge könnten verschiedene Enzymsysteme für den Abbau der Alkylphosphate im menschlichen Serum vorhanden sein, die einer neuen Untergruppe in der internationalen Enzymnomenklatur zuzuteilen sind (E.C. 3.1.8. Phosphotriesterasen).

Bis jetzt wird die Paraoxonase noch dem Enzym E.C. 3.1.1.2 (Arylesterase) zugeordnet, da bis zur Arbeit über die Spezifität der menschlichen Serum-paraoxonase (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al., 1973b) in der Literatur die Ansicht bestand, daß die Arylesterase sehr unspezifisch viele aromatische Ester spaltet, insbesondere Phenylacetat und Naphtylacetat.

GROSSHAUSER (1976) konnte allerdings zeigen, daß zwischen der Phenylacetat-spaltenden Aktivität des menschlichen Serums, bestimmt nach SIMPSON (1971), und der Paraoxon-spaltenden Aktivität der gleichen Seren, photometrisch über die p-Nitrophenolabspaltung bestimmt nach KRISCH (1968), keinerlei Korrelation besteht.

Für DFP konnte bis jetzt noch keine photometrische Methode ermittelt werden, die weitere Aussagen zur Existenz bzw. Spezifität einer DFP-ase im Serum ermöglichen würde.

Aufgrund der aufgeführten Untersuchungen über Echothiophat (ELLIS und ESTERDAHL, 1967; FAFF et al., 1975; HISCOX und McCULLOCH, 1966; MURRAY McGAVIN, 1965; WAHL und TYNER, 1965) könnte man daran denken, daß hier ein ähnliches Abbausystem vorliegt. Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der Anti-cholinesterasetechnik eine Methode zur Messung

einer eventuellen Echothiophatase-Aktivität zu entwickeln und damit unter Umständen Anhaltspunkte für die Existenz des Enzyms zu gewinnen.

Zum Vergleich werden Parallelversuche mit DFP angestellt, um einen möglicherweise vorhandenen Polymorphismus leichter differenzieren zu können und somit die Spezifität einer "Echothiophatase" zu überprüfen.

C Experimentelle Untersuchungen

1) Methode zur Messung der Serumcholinesterase-aktivität und deren Restaktivität nach Vergiftung mit Echothiophat bzw. DFP in der Warburgapparatur

Die Messungen zur Bestimmung der Serumcholinesterase-aktivität erfolgten in der Warburgapparatur nach der Methode von FRIEDBERG und SAKAI (1958). Als Substrat bei den Untersuchungen diente Butyrylcholinjodid, das durch die Pseudocholinesterase im Serum schnell abgebaut wird, nicht aber durch die Acetylcholinesterase. Aktivitäten anderer Enzyme können durch die Verwendung dieses spezifischen Substrats ausgeschlossen werden. So können auch in einem geringfügig hämolytischen Serum vergleichbare Messungen durchgeführt werden, da die bei der Hämolyse ausgetretene Erythrozyten-Acetylcholinesterase nicht an der Reaktion teilnimmt und deshalb die Meßwerte nicht beeinflußt (GOEDDE, DOENICKE und ALTLAND, 1967).

Bei Untersuchungen durch LINDORF (1971) und MEGERLE (1975) konnte außerdem nachgewiesen werden, daß bei gleicher Serummenge die Dauer des Versuchsablaufes bei Verwendung von Butyrylcholinjodid anstatt Acetylcholinchlorid um die Hälfte der Zeit herabgesetzt werden kann.

a) Bestimmung der geeigneten Konzentration und der spezifischen Inkubationsbedingungen für Echothiophat

Für die Untersuchung über die Inaktivierung von Echothiophat diente uns die für DFP ausgearbeitete

Methode (GREINER) als Grundlage, woraus wir die spezifischen Inkubationsbedingungen für Echothiophat erarbeiten konnten.

Bei den ersten Versuchen mit Testseren bekannter Aktivität stimmten wir die Inkubationsbedingungen für DFP auf die Methode von GREINER ab.

Für die Herstellung der Echothiophatlösung empfahl es sich zunächst, die gleichen Bedingungen wie für DFP einzuhalten, d.h. Herstellung in einem vom Meßbereich getrennten Raum mit Abzugsanlage, um wie bei DFP eine mögliche Vergiftung der aufgestellten Seren ausschließen zu können.

Da von der Firma Dr. Winzer (Chemisch-pharmazeutische Fabrik, Konstanz) Echothiophat-jodid als Trockensubstanz in Pulverform geliefert worden war, mußte zunächst eine Stammlösung hergestellt werden. Dazu wurden 50 mg Trockensubstanz in 50 ml ultrareinem Wasser gelöst und in einem mit Glasstopfen luftdicht verschlossenem Erlenmeyerkolben im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Trockensubstanz lagerten wir in einem zusätzlichen Behälter in der Tiefkühltruhe bei -22°C.

Für den ersten Versuchsablauf stellten wir eine Lösung analog der DFP-Lösung (GREINER) her. Da die DFP-Ausgangslösung 99,98 g% DFP enthielt, unsere Stammlösung mit Echothiophat-jodid aber nur 0,1 %ig war, gaben wir zur Herstellung von Lösung I (GREINER) nicht 1 µl, sondern 1 ml zu 120 ml ultrareinem Wasser. Der folgende Ansatz wurde beibehalten, d.h. Lösung II setzte sich zusammen aus 5 µl der Lösung I und 40 ml der Verdünnungslösung (Mischung

aus 10 Teilen einer 0,9 %igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26 %igen NaHCO_3 -Lösung). Beim ersten Versuchsablauf stellte sich heraus, daß die Manometer alle über das übliche Maß hinaus anstiegen, d.h. die Cholinesterase war nicht ausreichend gehemmt worden. Die Verdünnung war also zu stark gewesen, folglich mußte die Konzentration von Echothiophat in der Lösung II erhöht werden.

In der nächsten Versuchsreihe stellten wir deshalb verschieden konzentrierte Lösungen her, indem wir jeweils 1 ml der Stammlösung mit 10, 20, 50 und 100 ml Wasser mischten. Unser Ziel war, eine Konzentration herauszufinden, bei der die ChE-Restaktivität der Testseren im gleichen Ablesebereich lag wie bei Inkubation mit DFP. Die Lösungen mit 20 ml bzw. 50 ml Verdünnung ergaben Werte im unteren bzw. oberen Ablesebereich. In einer weiteren Versuchsreihe stellten wir die Lösung I mit 30, 35, 40 und 45 ml Wasser her. Die Mischung der Lösung I in 35 ml Wasser ergab die gesuchte Cholinesterase-Restaktivität der Testseren. Auch bei weiteren Versuchen mit anderen Testpersonen ergab sich mit diesem Ansatz ein günstiger Ablesebereich.

Anhand von Testseren überprüften wir die Haltbarkeit der Stammlösung. Wir versetzten über zwei Wochen hinweg jeden dritten Tag jeweils frisches Serum eines Probanden mit Echothiophat-jodid aus der gleichen Stammlösung und maßen die ChE-Restaktivität im später genauer aufgeführten Versuchsablauf. Die Werte der gemessenen ChE-Restaktivität blieben in dieser Zeit gleich, d.h. die Stammlösung zeigte keinen Aktivitätsabfall. Um Fehlversuche zu

vermeiden, setzten wir jeweils nach 14 Tagen eine neue Stammlösung an.

b) Gewinnung des Serums

Für die Untersuchungen wurde gesunden, nicht verwandten Personen 10 ml Venenblut mittels einer Serummonovette^R der Firma Sarstedt, Nümbrecht, entnommen. Möglichst rasch nach der Entnahme wurde das Blut bei 1600 U/min 15 Minuten lang in den Monovetten zentrifugiert. Bei richtigem, vor allem nicht zu langem Zentrifugieren zeigte sich keine Hämolyse. Das überstehende Serum wurde sofort in gereinigte Reagenzgläser umgekippt, wobei ein Trennmittel in den Serummonovetten ein sauberes Dekantieren ohne Verunreinigung durch Erythrozyten ermöglicht.

Das Serum wurde, falls die Messung noch am gleichen Tag durchgeführt wurde, im Kühlschrank bei 4°C, ansonsten aber in der Tiefkühltruhe bei -22°C aufbewahrt.

c) Angewandtes Meßverfahren

Wie bei den vorausgegangenen Bestimmungen der Paraoxonase-Aktivität (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et al., 1969, 1972, 1973) und der ChE-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP (GREINER) versuchten wir auch hier mittels der Anticholinesterase-Technik Aussagen über die Aktivität eines Echothiophat-inaktivierenden Enzyms zu erhalten, indem die relativen Restaktivitäten der Serumcholinesterase nach Inkubation mit Echothiophat ermittelt wurden.

Die Messung der Cholinesterase-Aktivität erfolgte in der Warburgapparatur, Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, nach der manometrischen Methode von AMMON (1934), in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (1958), jedoch mit einem pH von 7,2.

d) Herstellung der DFP- bzw. Echothiophat-Lösung

Zur Herstellung einer geeigneten DFP-Lösung wurde mit einer geeichten Mikropipette (Goldbrand) 1 μ l DFP auf 120 ml ultrareines Wasser in einen Erlenmeyerkolben gegeben (Lösung I). Nach kräftigem Schütteln (10 min) zur exakten Durchmischung wurden 5 μ l der Lösung I zu 40 ml Verdünnungslösung gegeben (Lösung II). Diese setzte sich zusammen aus 10 Teilen einer 0,9 %igen Natriumchlorid-Lösung und 3 Teilen einer 1,26 %igen Natriumhydrogenkarbonat-Lösung. Nach der Methode von GREINER wurde der Ansatz der Lösung mit DFP nicht im Meßraum, sondern in einem anderen Raum mit Abzugsanlage durchgeführt, da die Substanz, bedingt durch den hohen Dampfdruck, leicht flüchtig ist. Bei Herstellung im Meßraum muß deshalb mit Vergiftung aller für die Versuchsdurchführung bereitgestellten Seren gerechnet werden. Da die Giftlösung mit DFP gegenüber hohen Temperaturen sehr empfindlich reagiert und sogar schon bei längerer Aufbewahrung in Raumtemperatur (d.h. über eine Stunde) Aktivitätsverluste zeigte, wurde die Lösung während des Versuchsablaufes bei 4°C aufbewahrt und nur für kurze Zeit zur Beimischung zum Serum aus dem Kühlschrank geholt. Die Konzentration der Lösung II lag bei $c=5,64 \cdot 10^{-9}$ Mol DFP/l.

Aufgrund der Vorversuche wählten wir für die Herstellung der Echothiophat-Lösung folgenden Ansatz:

Aus 50 mg Echothiophat-jodid, gelöst in 50 ml Wasser, wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt, die bis zu zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahrt wurde (Lösung I). Dieser entnahmen wir 1 ml und verdünnten mit 35 ml ultrareinem Wasser in einem Erlenmeyerkolben (Lösung II). Diese Mischung war acht Minuten lang kräftig zu schütteln. Mit einer geeichten Mikropipette wurden 5 μ l in 40 ml der oben genau beschriebenen Verdünnungslösung gegeben, worauf wieder acht Minuten lang gut geschüttelt wurde (Lösung III). Die Konzentration betrug jetzt $c = 0,93 \cdot 10^{-8}$ Mol Echothiophat-jodid/l.

e) Inkubation mit Echothiophat bzw. DFP

Zur Vergiftung der Cholinesterase wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der Giftlösung im Reagenzglas versetzt. Die Konzentration lag nun bei $c = 0,83 \cdot 10^{-8}$ Mol Echothiophat-jodid/l bzw. $c = 5,09 \cdot 10^{-9}$ Mol DFP/l.

Von den Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes pipettiert, die sofort mit gut eingefetteten Schliffstopfen verschlossen und mit Gummibändern fixiert wurden.

Der Hauptraum der Gefäße enthielt 1,5 ml einer 0,546 %igen wässrigen Lösung von Butyrylcholin-jodid. Die Kölbchen wurden sofort mit gründlich eingefetteten Glasschliffen zur völligen Abdichtung an die Manometer angeschlossen, mit Zugfedern

fixiert und in ein Wasserbad von genau 37°C gebracht.

Nach 30 Minuten langem Schütteln ($f=100/\text{min}$) wurden alle Manometer mit einem Gasgemisch aus 5% CO_2 und 95% N_2 unter ständigem Schütteln 25 Minuten lang durchströmt, bis eine Gesamtinkubationsdauer von 60 Minuten erreicht war.

f) Messung der Serumcholinesteraseaktivität nach Vergiftung mit Echothiophat bzw. DFP

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Serumverdünnung aus den Anhangsbirnen in die Haupträume der Warburggefäße gekippt und die Schliffstopfen auf den Anhangsbirnen der Kölbchen um 180° gedreht und somit verschlossen. Der pH-Wert sank dadurch auf 7,2 (SÜLLMANN, 1964).

Bei geöffneten Hähnen wurde nun noch drei Minuten geschüttelt, anschließend die Manometervordifferenz abgelesen und das System mit den Manometerhähnen geschlossen.

Der Manometerstand wurde unter weiterem Schütteln nach 15 Minuten und nach 30 Minuten abgelesen.

Die Seren wurden in Doppelbestimmung mit und ohne Echothiophat bzw. DFP unter Verwendung von Butyrylcholinjodid auf ihre Restaktivität geprüft. Zur Erfassung der Eigenhydrolyse des Butyrylcholinjodids liefen je Versuchsreihe zwei Leerwerte mit, bei denen die Anhangsbirne des Warburggefäßes nur Verdünnungslösung enthielt. In einem Versuchsablauf konnten jeweils drei Seren getestet werden.

g) Bestimmung der Restaktivität

Die Werte nach 30 Minuten wurden mit den jeweils entsprechenden Manometerkonstanten multipliziert, die sich nach folgender Formel errechnen lassen (SÜLLMANN, 1964):

$$K = \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot a}{P_O}$$

$$V_G = V_K + V_M - 2ml$$

Dabei gilt:

V_G	=	Gasraumvolumen
T	=	Versuchstemperatur
V_F	=	Flüssigkeitsvolumen
a	=	Absorptionskoeffizient
P_O	=	Normaldruck

Genauso wurde mit den Leerwerten verfahren. Aus den Wertepaaren der Serumansätze wurde jeweils das arithmetische Mittel gebildet und davon der Mittelwert der Leerwerte subtrahiert.

Die Angabe der Ausgangsaktivität erfolgt in μl $CO_2/30$ min, bezogen auf 0,05 ml Serum, die der Restaktivität der Seren nach Vergiftung in % der Ausgangsaktivität.

h) Präzision der verwendeten Meßmethode

Um Aussagen über die Präzision der verwendeten Meßmethode machen zu können, wurde eine Qualitäts-

kontrolle durchgeführt. Zwei Versuchsabläufe mit einem Testserum, das eine ChE-Restaktivität im mittleren Ablesebereich aufwies, wurden deshalb ausgewertet, um so die eigene Arbeits- und Meßgenauigkeit zu überprüfen.

Aus jeweils 12 Meßwerten der Cholinesterase-Ausgangsaktivität, der absoluten Restaktivität und der relativen Restaktivität nach Vergiftung mit Echothiophat wurden Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient errechnet. Als statistischer Parameter gibt die Standardabweichung Auskunft über die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert. Eine vergleichende Aussage erlaubt jedoch eher die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient), bei der die Standardabweichung in Relation zum Mittelwert angegeben wird.

Berechnung der Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Berechnung des Variationskoeffizienten:

$$V_K = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

Dabei gilt: s = Standardabweichung der Einzelwerte

n = Anzahl der Testseren

i = Nummer des Serums

x_i = tatsächlicher Meßwert

$\bar{x}$ = Mittelwert

V_K = Variationskoeffizient

Tabelle 1

Meßwerte der Cholinesterase-Ausgangsaktivität, der absoluten Restaktivität und der relativen Restaktivität eines Testserums zur Bestimmung der Präzision

Nr.	ChE-Ausgangs-Aktivität ($\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$)	absolute Rest-aktivität ($\mu\text{l CO}_2/30\text{min}$)	relat. Rest-aktivität (%)
1	167,0	36,3	21,7
2	175,8	36,2	20,6
3	176,4	38,1	21,6
4	169,6	38,0	22,4
5	178,6	37,0	20,9
6	172,3	34,8	20,2
7	174,7	36,5	20,9
8	171,3	37,4	21,9
9	170,6	35,7	20,9
10	175,7	36,3	20,6
11	173,3	37,8	21,8
12	172,9	37,6	21,7
$\bar{x}$	173,2	36,8	21,3
s	3,27	1,03	0,66
V_K	1,89	2,80	3,13

Für die relative Restaktivität nach Vergiftung mit Echothiophat ergibt sich ein Variationskoeffizient von 3,13%, also weniger als 5%, demnach kann die Meßmethode und Arbeitsweise als hinreichend genau angesehen werden (Tab. 1).

i) Kontrolle der Meßmethode anhand eines Testserums

Die Meßergebnisse können auch durch eine Reihe von Bedingungen, die sich leicht ändern (z.B. Raumtemperatur, neu angesetzte Reagentien, Pipettenwechsel) beeinflußt werden. Damit auch die an verschiedenen Tagen gewonnenen Ergebnisse vergleichbar wurden, ließen wir bei jedem weiteren Versuchsablauf ein Testserum mit bekannter Restaktivität mitlaufen und konnten so äußere Einflüsse kontrollieren.

2) Versuchsergebnisse

Die Versuchsergebnisse von 31 nicht verwandten Personen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 2

Versuchsergebnisse der Messungen der Serumcholinesterase-Aktivität vor und nach Vergiftung mit Echothiophat ($0,83 \cdot 10^{-8}$ M) bzw. DFP ($5,09 \cdot 10^{-9}$ M) bei 31 nicht verwandten Personen

- I = Mittelwert der Ausgangsaktivität in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$
 II = absolute Restaktivität in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$
 III = relative Restaktivität in % der Ausgangsaktivität } nach Vergiftung mit Echothiophat
 IV = absolute Restaktivität in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$
 V = relative Restaktivität in % der Ausgangsaktivität } nach Vergiftung mit DFP

Proband	Geschlecht	Alter	I	II	III	IV	V
A.G.	w	42	172,5	40,4	22,1	21,4	13,2
B.I.	w	31	167,8	38,7	22,2	36,6	22,4
B.M.	m	23	201,7	47,5	24,9	30,7	14,4
B.L.	m	25	173,0	40,1	22,6	42,9	25,5
B.L.	w	51	204,6	56,3	24,7	71,5	34,9
B.K.	w	53	252,5	83,2	33,7	90,2	35,2
D.K.	m	23	204,7	49,8	23,2	56,9	29,2
E.V.	m	27	217,3	53,3	23,9	82,4	38,9
F.A.	w	55	164,3	27,7	16,1	28,3	18,1
F.H.	w	21	181,3	35,5	19,7	53,3	29,2
H.I.	w	51	196,5	48,9	23,5	45,3	24,2
H.G.	m	31	213,0	50,2	22,9	71,5	34,5
K.W.	m	26	135,0	38,9	28,1	18,8	14,3

Proband	Geschlecht	Alter	I	II	III	IV	V
K.J.	m	27	189,0	41,5	21,1	55,1	30,2
L.E.	w	37	201,9	85,1	42,0	72,8	36,1
M.H.	m	44	218,9	68,9	31,8	55,9	26,8
M.R.	m	18	238,2	73,4	30,1	82,1	35,2
M.S.	w	14	200,9	50,5	25,0	49,3	24,7
M.W.	w	43	126,5	23,1	17,9	16,9	13,6
N.M.	w	31	175,6	26,5	16,0	25,1	13,5
P.S.	m	23	255,2	94,3	35,5	100,8	41,2
R.Ch.	w	14	184,2	42,1	22,2	48,5	27,1
S.H.	w	23	165,8	31,1	19,1	42,5	25,2
S.R.	m	24	182,1	49,1	27,2	38,1	20,7
S.I.	w	21	202,1	44,6	22,3	59,4	29,1
S.B.	m	59	130,5	38,9	29,5	19,1	14,8
S.A.	w	37	159,5	42,4	26,7	20,8	12,9
S.B.	m	25	209,2	38,6	18,8	46,5	21,8
W.A.	m	57	189,4	55,1	28,1	38,5	21,1
W.I.	w	49	140,6	23,7	17,1	35,5	24,8
W.F.	m	57	200,1	52,9	34,2	61,6	27,9

In den folgenden Abbildungen wird die Verteilung der relativen Restaktivität nach Vergiftung mit Echothiophat (Abb. 11) und DFP (Abb.12) graphisch dargestellt.

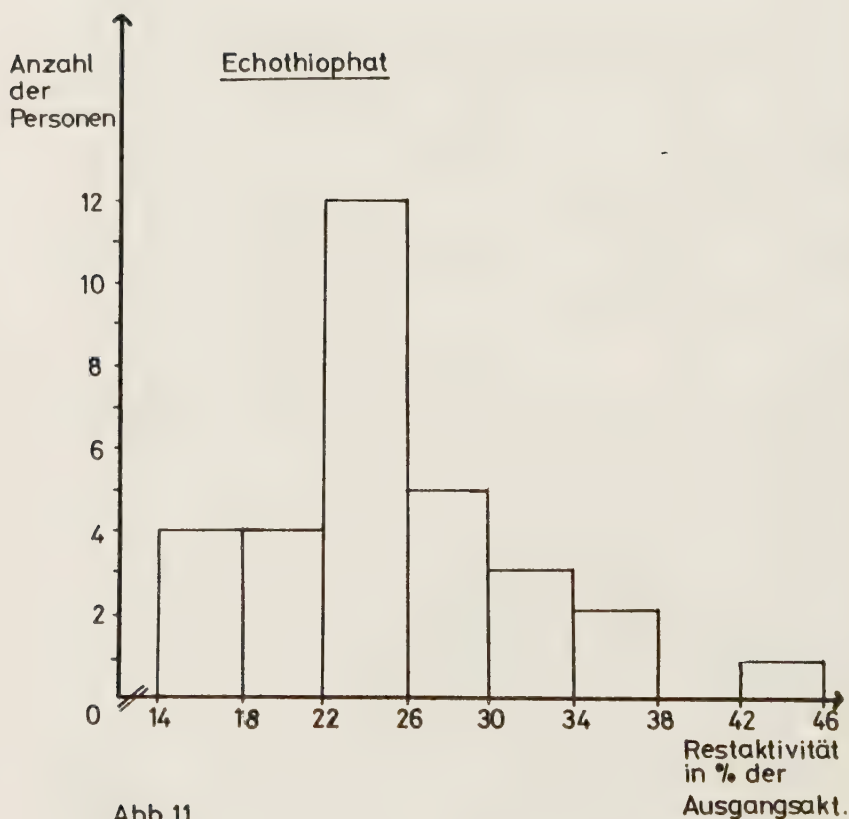
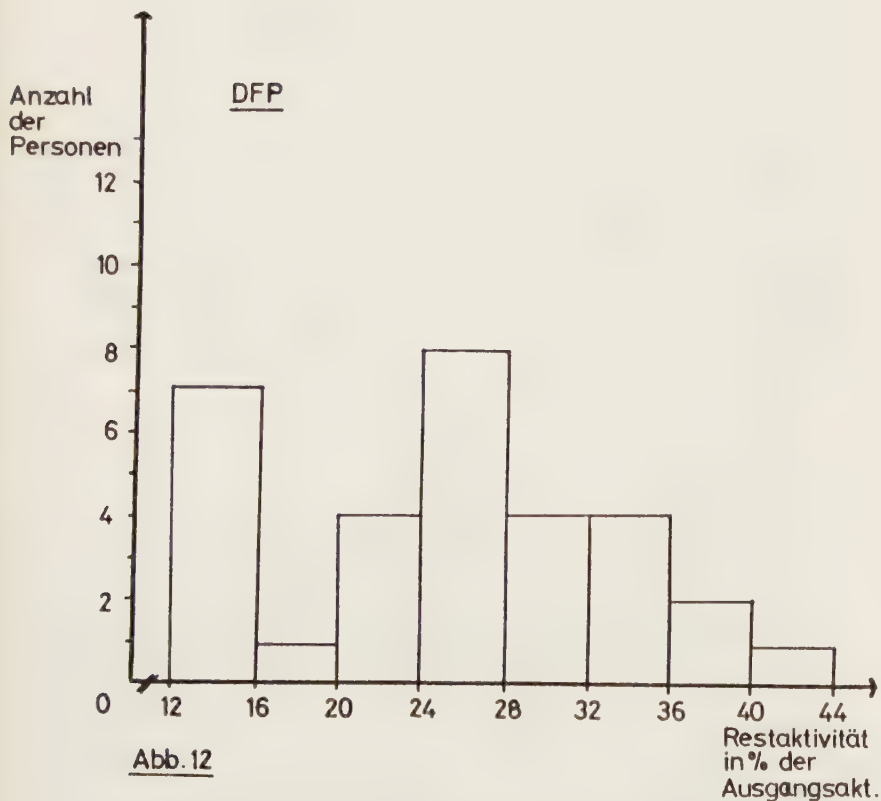


Abb. 11

Häufigkeitsverteilung der relativen Cholinesterase-Restaktivität von 31 nicht verwandten Personen (Werte aus Tab. 2) nach Vergiftung mit Echothiophat



Häufigkeitsverteilung der relativen Cholinesterase-Restaktivität von 31 nicht verwandten Personen (Werte aus Tab. 2) nach Vergiftung mit DFP

Da die Verteilung der Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit Echothiophat bzw. DFP möglicherweise geschlechtsgebunden vorliegt, wird die relative Restaktivität der Serum-ChE nach Inkubation mit DFP (Abb. 13) bzw. Echothiophat (Abb. 14) getrennt nach männlichen und weiblichen Probanden dargestellt.

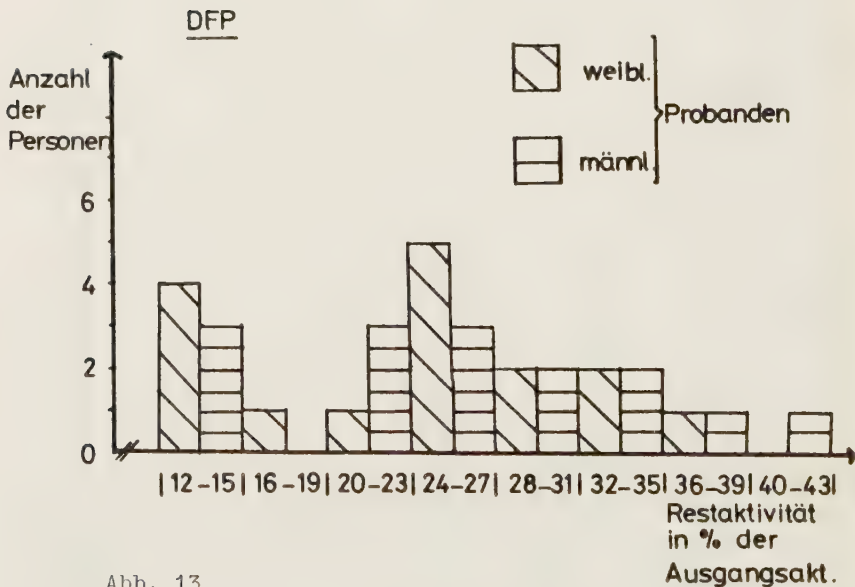


Abb. 13

Häufigkeitsverteilung der relativen ChE-Restaktivität nach Vergiftung mit DFP, getrennt nach dem Geschlecht der 31 Probanden

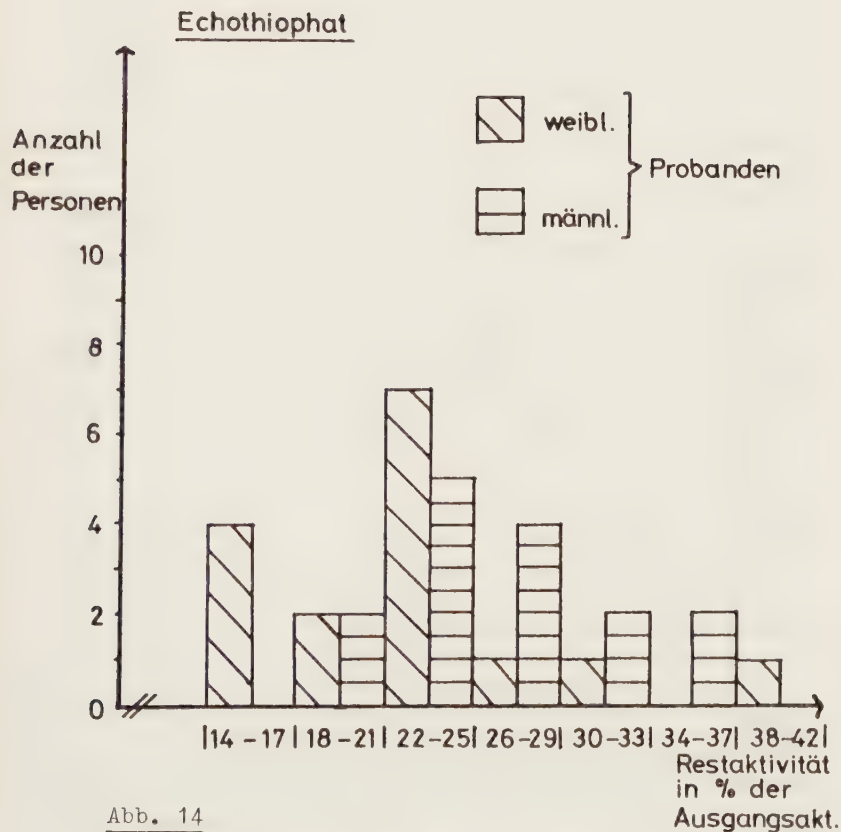


Abb. 14

Häufigkeitsverteilung der relativen ChE-Restaktivität nach Vergiftung mit Echothiophat, getrennt nach dem Geschlecht der 31 Probanden

Die Korrelation der relativen Restaktivität der Cholinesterase nach Vergiftung mit Echothiophat zur ChE-Ausgangsaktivität zeigt Abb. 15, der errechnete Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,47$.

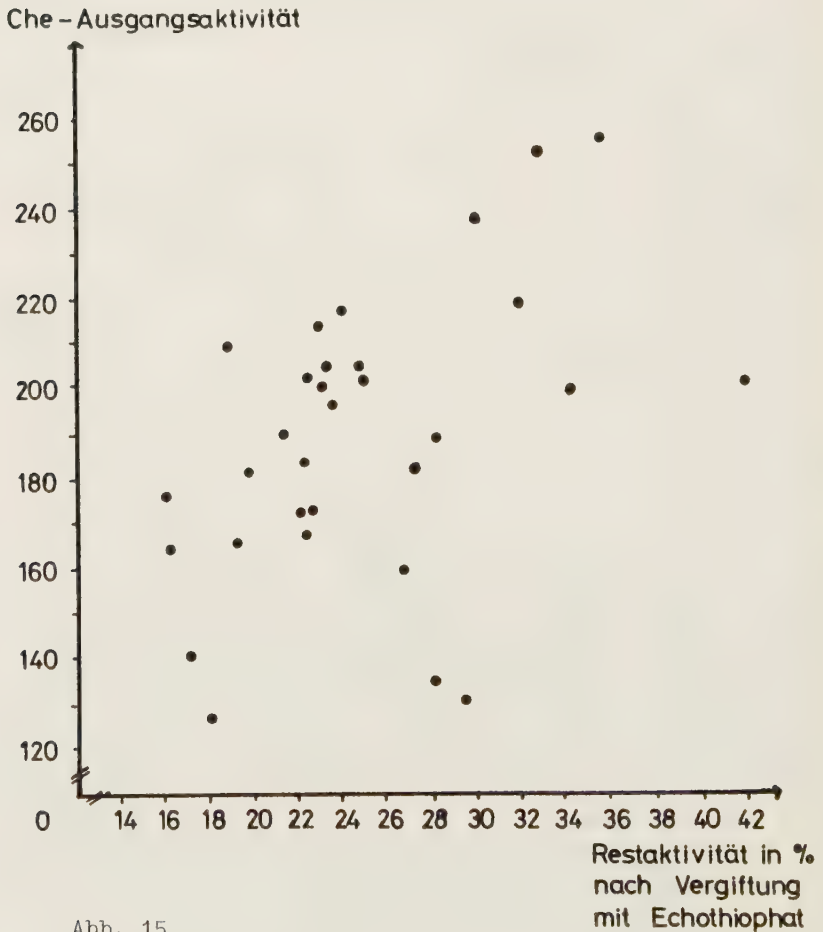


Abb. 15

Korrelation der ChE-Restaktivität in % nach Vergiftung mit Echothiophat zur ChE-Ausgangsaktivität

In Abb. 16 wird die Korrelation der relativen ChE-Restaktivität nach Vergiftung mit Echothiophat zu der nach Vergiftung mit DFP dargestellt. Hier beträgt der Korrelationskoeffizient $r = 0,42$.

Restaktivität in %
nach Vergiftung
mit DFP

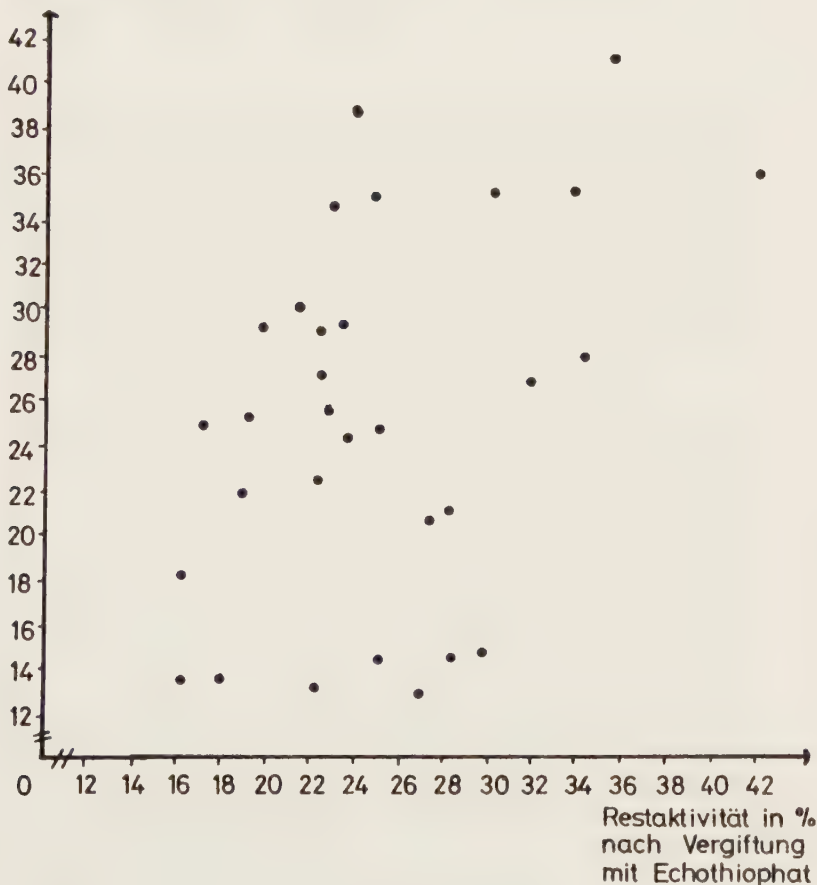


Abb. 16

Korrelation der ChE-Restaktivität in % nach Vergiftung mit Echothiophat zu der nach Vergiftung mit DFP

D Diskussion und Zusammenfassung

Die gewonnenen Ergebnisse lassen folgende Aussagen zu:

Mit Hilfe der Anticholinesterase-Technik in der Warburgapparatur ist es möglich, die Restaktivität der Cholinesterase nach Vergiftung mit Echothiophat bzw. DFP zu bestimmen.

Nachdem bei Versuchen mit Paraoxon mittels derselben Technik die Existenz eines spezifischen, hydrolysierenden Enzyms, der Paraoxonase, belegt wurde, war hier zu prüfen, ob in ähnlicher Weise die gemessene Restaktivität der Cholinesterase nach Vergiftung des Serums mit Echothiophat bzw. DFP als Ausdruck der Wirkung einer im menschlichen Serum vorhandenen Echothiophatase bzw. DFP-ase angesehen werden konnte.

Sowohl in Abb. 11 wie in Abb. 12 läßt sich eine unimodale Verteilung der relativen Restaktivität der Cholinesterase nach Vergiftung mit DFP bzw. Echothiophat erkennen.

Zur Frage der Existenz einer Echothiophatase wurde deshalb die Korrelation der relativen Restaktivität der Cholinesterase nach Vergiftung mit Echothiophat zur relativen Restaktivität der Cholinesterase nach Vergiftung mit DFP dargestellt. Aus dem errechneten Korrelationskoeffizienten wird ersichtlich, daß es sich, wenn überhaupt, vermutlich um zwei verschiedene Enzymsysteme handelt, in keinem Fall aber um Paraoxonase wegen fehlender Trimodalität.

Zwischen der Cholinesterase-Ausgangsaktivität und der relativen Restaktivität der Cholinesterase

nach Vergiftung mit Echothiophat läßt sich keine eindeutige Korrelation herstellen. Der errechnete Korrelationskoeffizient $r = 0,47$ weist darauf hin, daß nicht nur eine Titration der jeweiligen Cholinesterase stattgefunden hat, sondern unter Umständen mittels der verwendeten Technik die Aktivität einer möglichen Echothiophatase im menschlichen Serum nachgewiesen werden könnte.

Die nach männlichen und weiblichen Probanden getrennt dargestellten Verteilungen der relativen Restaktivität der Cholinesterase nach Vergiftung mit Echothiophat bzw. DFP lassen vermuten, daß sowohl bei Echothiophat wie auch bei DFP die durchschnittliche Aktivität einer Echothiophatase bzw. DFP-ase bei den männlichen Probanden etwas höher läge als bei den weiblichen Probanden. Der errechnete Durchschnittswert der relativen Restaktivität der Cholinesterase nach Vergiftung mit Echothiophat liegt mit $\bar{x} = 26,8 \%$ für männliche Probanden tatsächlich über dem Mittelwert $\bar{x} = 23,1 \%$ für weibliche Probanden. Für DFP ist der Unterschied mit Durchschnittswerten von $\bar{x} = 25,4 \%$ für männliche Probanden und $\bar{x} = 24,0 \%$ für weibliche Probanden nicht so stark ausgeprägt.

Weitere Untersuchungen mit grösseren Kollektiven müssen zeigen, ob die Restaktivität der Serumcholinesterase nach Vergiftung mit Echothiophat tatsächlich zu höheren Werten neigt als bei weiblichen Probanden und damit ein geschlechtsgebundenes Verhalten angenommen werden muß.

Darüberhinaus genügt es natürlich nicht, nur mit einer einzigen Methode auf die Anwesenheit einer

Echothiophatase zu prüfen.

Wie bei Paraoxon über die Messung des bei der Hydrolyse abgespaltenen p-Nitrophenols eine weitere Methode zur Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität gefunden wurde, so ist auch bei Echothiophat eine derartige photometrische Methode denkbar über die Messung des abgespaltenen Thiocholins.

Versuche in dieser Richtung mit grösseren Kollektiven müssen zeigen, ob sich unsere Vermutungen als richtig erweisen.

E Literaturverzeichnis

Aldridge, W.N.:

Serum Esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination
Biochem. J. 53:110 (1953a)

Aldridge, W.N.:

Serum Esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera
Biochem. J. 53:117 (1953b)

Ammon, R.:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins
Pflügers Arch. ges. Physiol. 233:486 (1934)

Barr, R.D., Ross, S.A.G., McIntosh, J.A. and Williams, J.O.:

Physical influences on the in vitro binding of di-isopropylfluorophosphate (DF²²P) to human erythrocytes
Med. Lab. Technol. 32:41 (1975)

Becker, B., Pyle, G.C. and Drews, R.C.:

The tonographic effects of echothiophate (phospholine) iodide: reversal by Pyridine-2-aldoxime methiodide (P2AM)
Amer. J. Ophthal. 47:635 (1959)

Ben Dor, D. and Weisenberg, E.:

The effect of phospholine iodide eye drops on blood cholinesterase in glaucoma patients
Israel. J. Med. Sci. 2:624 (1966)

Breinin, G.M., Chin, N.B. and Ripps, H.:

A rationale for therapy of accommodative strabismus
Amer. J. Ophthal. 61:1030 (1966)

Cohen, J.A. and Warringa, M.G.P.J.:

The fate of P³² labelled diisopropylfluorophosphonate in the human body and its use as a labelling agent in the study of turnover of blood plasma and red cells
J. Clin. Invest. 32:459 (1954)

- Cohen, J.A. and Warringa, M.G.P.J.:
Purification and properties of dialkyl-
fluorophosphatase
Biochem. Biophys. Acta 26:29 (1957)
- Cohen, S.W.:
Management of errors of refraction with
echothiophate iodide
Amer. J. Ophthal. 62:302 (1966)
- Comroe, J.H., Todd, J. and Koelle, G.B.:
The pharmacology of diisopropylfluoro-
phosphate (DFP) in man
J. Pharmacol. Exper. Therap. 87:281 (1946)
- Ehrhart, G.:
Arzneimittel - Entwicklung, Wirkung,
Darstellung, Bd. 2
Weinheim/Bergstr. (1972)
- Ellis, P.P. and Esterdahl, M.:
Echothiophate iodide therapy in children
Arch. Ophthal. 77:598 (1967)
- Erdmann, W.D. und Latki, O.:
Vergiftung mit Diisopropylfluorophosphat (DFP)
Arch. Toxikol. 18:151 (1960)
- Faff, J., Borkowska, G., Bak, W. and Raszewski, W.:
Acetylcholinesterase activity in the rat
tissues during chronic phospholine poisoning
Acta Physiol. Pol. 26:517 (1975)
- Forth, W., Henschler, D. und Rummel, W.:
Allgemeine und Spezielle Pharmakologie
und Toxikologie
Mannheim (1977)
- Freedman, A.M., Willis, A. and Himwich, H.E.:
Correlation between signs of toxicity and
cholinesterase level of brain and blood
during recovery from diisopropylfluoro-
phosphate (DFP) poisoning
Am. J. Physiol. 157:80 (1949)
- Friedberg, K.D. und Sakai, F.:
Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit
Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox)
im Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines
fermentreaktivierenden Antidots (Pyridin-
Aldoxim-Methyl-jodid, PAM)
Dtsch. Z. ges. Gerichtl. Med. 47:580 (1958)

- Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Rabast, U. und
Lindorf, H.H.:
Unterschiedliche Reaktion menschlicher
Serum-Cholinesterasen mit E 600
(O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat)
Arch. Toxikol. 25:223 (1969)
- Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Baumgartner, W.,
Petenyi, M., Burgis, H., Lindorf, H.H. und
Metzner, H.:
Korrelation zwischen der unterschiedlichen
Vergiftbarkeit der Serumcholinesterase
durch E 600 und der Aktivität des E 600-
spaltenden Enzymsystems in menschlichen
Seren
Hoppe-Seyler's Z., Physiol. Chem. 353:217 (1972)
- Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Lindorf, H.H., Petenyi, M.,
Flügel, M., Fischer, Th. und Hiller, Th.:
Genetisch determinierter Polymorphismus
der menschlichen Serum-Paraoxonase
(E.C. 3.1.1.2.)
Humangenetik 17:331 (1973a)
- Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Petenyi, M., Flügel, M.,
Burgis, H., Dietzel, B., Metzner, H.,
Nirschl, H. und Renner, O.:
Zur Spezifität der menschlichen Serum-
Paraoxonase
Z. Physiol. Chem. 354:337 (1973b)
- Geldmacher-v.Mallinckrodt, M., Hommel, G. und Dumbach, J.:
On the genetics of the human serum paraoxonase
Hum. Genet. 50:313 (1979)
- Gellman, M.A.:
The use of miotics for the correction of
hypermetropia and accommodative esotropia
Amer. J. Optom. 40:93 (1963)
- Gellman, M.A.:
The use of drugs in the diagnosis and
treatment of strabismus
Amer. J. Optom. 41:574 (1964)
- Goedde, H.W., Doenicke, A. und Altland, K.:
Pseudocholinesterasen
Springer-Verlag, Berlin (1967)

- Greiner, G.:
Methode zur Bestimmung der Restaktivität
der Serum-Cholinesterase (E.C. 3.1.1.8.)
im menschlichen Serum nach Vergiftung
mit DFP
Dissertation Erlangen (1980)
- Grob, D., Lilienthal, J.L., Harvey, A.M. and Jones, B.F.:
The administration of Di-isopropyl fluoro-
phosphate (DFP) to man. I. Effect on plasma
and erythrocyte cholinesterase, general
systemic effects; use in study of hepatic
function and erythropoiesis; and some
properties of plasma cholinesterase
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81:217 (1947a)
- Grob, D., Harvey, A.M., Langworthy, O.R. and
Lilienthal, J.L.jr.:
The administration of Di-isopropyl fluoro-
phosphate (DFP) to man. III. Effect on
the central nervous system with special
reference to the electrical activity of
the brain
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81:257 (1947b)
- Grosshauser, F.J.:
Zur Spezifität der menschlichen Serum-
Paraoxonase; vergleichende Untersuchungen
mit den Substraten Paraoxon, Phenylacetat
und β -Naphthylacetat
Dissertation Erlangen (1976)
- Hallett, M. and Cullen, R.F.:
Intoxication with Echothiophate iodide
JAMA 222:1414 (1972)
- Hansen, D., Schaum, E. and Wassermann, O.:
Serum level and excretion of Di-isopropyl-
fluoro- phosphate (DFP) in cats
Biochem. Pharmacol. 17:1159 (1968)
- Harvey, A.M., Lilienthal, J.L.jr., Grob, D., Jones, B.F.
and Talbot, S.A.:
The administration of Di-isopropyl fluoro-
phosphate to man. IV. The effect on neuro-
muscular function in normal subjects and
in myasthenia gravis
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81:267 (1947)

- Havener, W.H.:
Ocular Pharmacology
The C.V. Mosby Company, St. Louis (1974)
- Hermans, G. et Marynen de Preter, L.:
L'emploi d'organophosphates en ophtalmologie
et leur repercussion sur le système
enzymatique
Acta Anaesthesiol. Belg. 23:122 (1972)
- Heymans, C. and Casier, H.:
Inactivation of cholinesterase by Di-iso-
propyl-fluorophosphate (DFP) in chronic
experiments
Arch. int. pharmacodyn. 77:64 (1948)
- Hiscox, P.E.A. and McCulloch, C.:
Cardiac arrest occurring in a patient on
echothiophate iodide therapy
Amer. J. Ophthal. 60:425 (1965)
- Hiscox, P.E.A. and McCulloch, C.:
The effect of echothiophate iodide on
systemic cholinesterase
Canad. J. Ophthal. 1:274 (1966)
- Hjort, P.F., Paputchis, H. and Cheney, B.:
Labelling of red blood cells with radioactive
Diisopropylfluorophosphate (DFP-³²) evidence
for an initial release of label
J. Lab. & Clin. Med. 55:416 (1960)
- Hoffmann, K.:
Phospholinjodid in der Behandlung des
Glaukoms
Klin. Monatsbl. Augenheilkunde 158:413 (1971)
- Horton, R.G., Koelle, G.B., Mc Namara, B.P. and Pratt, H.J.:
The acute toxicity of Diisopropylfluoro-
phosphate
J. Pharmac. Exp. Ther. 87:414 (1946)
- Jandorf, B.J. and Mc Namara, P.D.:
Distribution of radiophosphorus in rabbit
tissues after injection of phosphorus-
labelled Diisopropylfluorophosphate
J. Pharmac. Exp. Ther. 98:77 (1950)
- Kadin, M.:
Chronic effects of miotic drugs studies
of anticholinesterase activity and functional
adaption to antiglaucoma drugs
Arch. Environ. Health 6:736 (1963)

- Kitamura, S., Oguri, K. und Kozaki, K.:
The effect of administration of miotics
on serum cholinesterase
Jpn. J. Anaesthesiol. 23:1225 (1974)
- Krisch, K.:
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-
p-nitrophenyl-phosphat (E 600) durch
menschliches Serum
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6:41 (1968)
- Leopold, J.H. and Comroe, J.H.jr.:
Use of diisopropyl fluorophosphate ("DFP")
in treatment of glaucoma
Arch. Opth. 36:1 (1946a)
- Leopold, J.H. and Comroe, J.H.jr.:
Effect of diisopropyl fluorophosphate
("DFP") in the normal eye
Arch. Opth. 36:17 (1946b)
- Leopold, J.h., Gold, P. and Gold, D.:
Use of a thiophosphinyl quaternary compound
(217-MI) in treatment of glaucoma
Arch. Opth. 58:363 (1957)
- Lindorf, H.H.:
Untersuchungen zur Ursache der unter-
schiedlichen Reaktion menschlicher Serum-
Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-
O-(p-nitrophenyl)-phosphat)
Dissertation Erlangen (1971)
- Mazur, A. and Bodansky, O.:
The mechanism of in vitro and in vivo
inhibition of cholinesterase activity
by Diisopropyl fluorophosphate
J. Biol. Chem. 163:261 (1946a)
- Mazur, A. and Bodansky, O.:
An enzyme in animal tissues capable of
hydrolysing the phosphorus-fluorine
bond of alkylfluorophosphate
J. Biol. Chem. 164:271 (1946b)
- Mc Combie, H. and Sounders, B.C.:
Alkylfluorophosphonates, preparation and
physiological properties
Nature 157:287 (1946)

- Megerle, U.:
Vergleichende Untersuchungen zur optimalen Bestimmung der Paraoxonasetypen im menschlichen Serum mit verschiedenen Substraten
Dissertation Erlangen (1975)
- Moore, W.K.S.:
Two cases of poisoning with Di-isopropylfluorophosphonate (D.F.P.)
Brit. J. industr. Med. 13:214 (1956)
- Mounter, L.A., Alexander, H.C., Tuck, K.D. and Dien, L.H.T.:
The pH dependence and dissociation constants of esterases and proteases treated with Diisopropylfluorophosphate
J. Biol. Chem. 226:867 (1957)
- Murray Mc Gavin, D.D.:
Depressed levels of serum-pseudocholinesterase with echothiophate-iodide eyedrops
The Lancet 2:272 (1965)
- Naess, K.:
The specificity of Diisopropylfluorophosphate (DFP)
Acta pharmacol. et toxicol. 12:154 (1956)
- Neurath, A.R.:
A component splitting Diisopropylfluorophosphate in Sendai and Newcastle disease virus preparations; its possible identity with haemolysin
Acta virol. 9:25 (1965)
- Nowotny, P., Preußner, S., Konrad, H. und Kiencke, H.:
Granulocytenkinetik mit radioaktivem Diisopropylfluorophosphat (DF³²P)
Folia haematol. 94:326 (1970)
- Osserman, K.E., Cohen, E.S. and Jenkins, G.:
Phospholine iodide: an anticholinesterase drug of new structure. Preliminary report in the treatment of myasthenia gravis
In: Viets, H.R. (ed.): Myasthenia gravis, Springfield/Ill. 581 (1961)
- Playfer, J.R., Eze, L.C., Bullen, M.F. and Evans, D.A.P.:
Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity
J. Med. Gen. 13:337 (1976)

Quilliam, J.P.:

Di-iso-propylfluorophosphonate (DFP)
its pharmacology and its therapeutic uses
in glaucoma and myasthenia gravis
Post-Grad. M.J. 23:280 (1947)

Ramachandran, B.V.:

Catalytic effect of phosphate and oximes
on non-enzymic hydrolysis of Diisopropyl
Phosphorofluoridate
Indian J. Biochem. Biophys. 8:112 (1971)

De Roethth, A.jr., Dettbarn, W.-D., Rosenberg, P.,
Wilensky, J.G. and Wong, A.M.:

Effects of phospholine iodide on blood
cholinesterase levels of normal and
glaucoma subjects
Am. J. Ophthal. 59:586 (1965)

De Roethth, A.jr., Wong, A., Dettbarn, W.-D., Rosenberg, P.
and Wilensky, J.G.:

Blood cholinesterase activity of glaucoma
patients treated with Phospholine Iodide
Amer. J. Ophthal. 62:834 (1966)

Rump, S., Galecka, E., Grudzinska, E., Jiozuk, I.
and Rabsztyn, T.:

New trends in experimental therapy of
organophosphate intoxications
Environ. Qual. Saf. 3:609 (1975)

Schlaak, M.:

Schwere Vergiftung mit Diisopropyl-
fluorophosphat
Arch. Toxikol. 22:155 (1966)

Schrader, G.:

Die Entwicklung neuer insektizider
Phosphorsäureester
Weinheim/Bergstr., Verlag Chemie (1963)

Sedan, J.:

Intoxications par le D.F.P., observées
en series dans un laboratoire de Biochimie
Ann. ocul. 185:903 (1952)

Silver, S.D.:

The toxicity of dimethyl-, diethyl- and
diisopropyl fluorophosphate vapors
J. Indust. Hyg. & Toxicol. 30:307 (1948)

Simpson, N.E.:

Serum arylesterase levels of activity
in twins and their parents
Am. J. Hum. Genet. 23:375 (1971)

Süllmann, E.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung
des Gewebestoffwechsels
In: Lang, K. und Lehnartz, E. (Hrsg.):
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-
chemischen Analyse. Bd. IV, Teil A.
Springer Verlag, Berlin (1964)

Verbeke, R.:

Sur la pharmacologie du Di-isopropylfluoro-
phosphonate (DFP)
Arch. int. pharmacodyn. 75:415 (1948)

Verbeke, R.:

Nouvelles contributions à la pharmacologie
du Diisopropyl-fluorophosphonate (DFP)
Arch. int. pharmacodyn. 79:1 (1949)

Wahl, J.W. and Tyner, G.S.:

Echothiophate iodide
Amer. J. Ophthal. 60:419 (1965)

Wilensky, J.G., Dettbarn, W.-D., Rosenberg, P. and
de Roethth, A.jr.:

Effect of ocular instillation of echothiophate
iodide and isofluorophate on cholinesterase
activity of various rabbit tissues
Amer. J. Ophthal. 64:398 (1967)

Zech, R. und Zürcher, K.:

Organophosphate splitting enzymes in
different animals
Comp. Bioch. Physiol. 48:427 (1974)

Für die Arbeitsmöglichkeit im Labor des Institutes für Rechtsmedizin, sowie für die freundliche Übernahme des Koreferats, möchte ich mich hiermit bei Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt für die Übernahme des Themas, die große Hilfsbereitschaft und den jederzeit freundlich erteilten Rat.

Lebenslauf

Personalien: Elisabeth Häusler
geb. am 24. März 1955 in Walderbach/Cham
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern:
Franz Xaver Häusler, Amtsrat i.R.
Irmgard Häusler, geb. Moser, Oberlehrerin

Ausbildung: Schule:
1961 bis 1965 Volksschule in Regensburg
1965 bis 1974 Humanistisches Gymnasium
(Albertus-Magnus-Gymnasium) in Regensburg
Juni 1974 Reifeprüfung am Albertus-Magnus-
Gymnasium

Studium:
WS 1974/75 Studium der Chemie an der
Universität Regensburg

Seit Sommersemester 1975 Studium der
Humanmedizin an der Universität Erlangen-
Nürnberg

März 1977 Ärztliche Vorprüfung

März 1978 Erster Abschnitt der ärztlichen
Prüfung

März 1980 Zweiter Abschnitt der ärztlichen
Prüfung

Von April 1980 bis März 1981 Ausbildung
im Praktischen Jahr am Lehrkrankenhaus Hof,
Abt. Innere Medizin, Chirurgische Univer-
sitätsklinik Erlangen und Inselspital
Bern/Schweiz, Universitätskinderklinik.

April 1981 schriftlicher Teil des dritten
Abschnitts der ärztlichen Prüfung

Mai 1981 mündlicher Teil des dritten Abschnitts
der ärztlichen Prüfung

Elisabeth Häusler

